

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

**FORMACION DE COMPLEJOS DE INCLUSION ENTRE
RETINOIDES Y CICLODEXTRINAS: CARACTERISTICAS,
PROPIEDADES Y VENTAJAS ANALITICAS**

TESIS DOCTORAL

**Silvia Muñoz Botella
Mayo, 1994**

Phonetic: St. St.

TRIBUNAL

President: Sr. Dr. Esperanza Torija Jorda
 Vocal: Sr. Dr. Miguel Velezuel Cases
 Vocal: Sr. Dr. Manuel Dabio Barrios
 Vocal: Sr. Dr. José Wroonka de Hveis
 Secretario: Sr. Dr. Sofia Reichung de la
Pachia



FACULTAD DE FARMACIA

BENITO DEL CASTILLO GARCIA, CATEDRATICO DE UNIVERSIDAD Y MARIA ANTONIA MARTIN CARMONA, PROFESORA TITULAR E.U. DE TECNICAS INSTRUMENTALES DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA U.C.M. Y DAN A. LERNER, CATEDRATICO DE QUIMICA-FISICA E INFORMATICA DE LA ESCUELA NACIONAL SUPERIOR DE QUIMICA DE MONTPELLIER, DIRECTORES DEL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION

CERTIFICAN: que Doña Silvia Muñoz Botella ha realizado en el Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid el programa de Doctorado "Análisis y Control de Medicamentos y Tóxicos" y bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado ***"Formación de complejos de inclusión entre retinoides y ciclodextrinas: Características, propiedades y ventajas analíticas"***, para optar al grado de Doctor en Farmacia por lo que autorizamos su presentación como Tesis Doctoral, ya que a nuestro juicio se han cubierto los objetivos propuestos.

Y para que conste expedimos y firmamos el presente certificado.

Madrid, 25 de marzo 1994

Montpellier, 5 de abril 1994



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatología

DÑA. M^a ESPERANZA TORIJA ISASA, CATEDRATICA Y DIRECTORA DEL
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II (BROMATOLOGIA) DE LA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

que el presente trabajo de investigación titulado "***Formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y retinoides: Características, propiedades y ventajas analíticas***", dirigido por los doctores Benito del Castillo García, María Antonia Martín Carmona y Dan A. Lerner, constituye la memoria presentada por Dña. Silvia Muñoz Botella para optar al grado de Doctor en Farmacia y reúne las condiciones exigidas para su lectura y defensa pública.

Lo que certifico en Madrid, a veinticinco de abril de mil novecientos noventa y cuatro.

Esperanza Torija

*Dedico esta Tesis a mis padres
con todo cariño*

En primer lugar, tengo que agradecer a mis directores de Tesis, los doctores Benito del Castillo García, María Antonia Martín Carmona y Dan A. Lerner, la dirección de esta Tesis Doctoral y las enseñanzas que he recibido de ellos a lo largo de estos años de trabajo común.

A la Dra. M. Esperanza Torija Isasa, Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología (Bromatología) y a la Dra. Sofía Ródenas de la Rocha, Directora de la Sección Departamental de Química Analítica de la Facultad de Farmacia, por haber aceptado formar parte del Tribunal.

Debo destacar el apoyo recibido en todo momento por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia y por la Universidad Complutense de Madrid, que me concedió una beca predoctoral para la realización de esta Tesis. Asimismo quiero dar las gracias al ACTIM (Agence pour la Coopération Technique et Industrielle) por la concesión de la beca que hizo posible mi estancia en el Laboratoire de Chimie-Physique et Informatique de la ENSCM (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier).

Debo un reconocimiento especial a los investigadores, que especializados en algunas técnicas concretas, han contribuido decisivamente en determinados capítulos de esta memoria. Mi agradecimiento al Dr. Menéndez Ramos, del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la U.C.M, por la obtención e interpretación de los espectros de RMN, al Dr. Román Zaragoza, del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia, por la obtención de las curvas de termogravimetría y al profesor J.-C. Guilleux del Laboratoire de Chimie-Physique et Informatique de la ENSCM, por su ayuda en la elaboración de los modelos moleculares.

Quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio los continuos ánimos que me han infundido y la paciencia con la que me han soportado. Muy especialmente quiero dar las gracias a Toñi: sin su dedicación, experiencia y entusiasmo, esta Tesis no hubiera sido posible, y a Tito, que con sus conocimientos técnicos y sus "manitas de plata" consiguió resolver muchos de los pequeños grandes problemas que se presentan a menudo en todo trabajo experimental.

Gracias a mis amigos, por el apoyo moral que he recibido constantemente por su parte. En particular quiero destacar el estímulo y comprensión que he encontrado siempre en Marisa y la colaboración inestimable que en todos los aspectos me ha brindado Luis.

Finalmente mi gratitud a mi familia y a todos los que de un modo u otro han contribuido a que esta Tesis pueda ver la luz.

INDICE

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DE ESTA MEMORIA	3
RETINOIDES	9
PAPEL BIOLOGICO DE LOS RETINOIDES	9
NOMENCLATURA	11
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y ESPECTROSCOPICAS	13
<i>CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LOS POLIENOS Y LOS</i> <i>RETINALES</i>	16
<i>CARACTERISTICAS DE EMISION EN LOS RETINALES</i>	18
<i>CARACTERISTICAS DE EMISION DE OTROS RETINOIDES</i>	19
TECNICAS INSTRUMENTALES EN EL ESTUDIO DE RETINOIDES	22
PROPIEDADES QUIMICAS: REACCIONES DE LOS RETINOIDES	25
<i>REACCIONES DE LA CADENA LATERAL</i>	25
<i>REACCIONES DE ADICION Y OXIDACION</i>	26
<i>DIMERIZACIONES OXIDATIVAS Y ELECTORREDUCCIONES</i>	26
<i>FOTOQUIMICA DE LOS RETINOIDES</i>	26
METODOS DE ANALISIS DE RETINOIDES	29
<i>METODOS QUIMICOS E INSTRUMENTALES</i>	29
<i>METODOS BIOLOGICOS</i>	39
INTERACCIONES ENTRE MOLECULAS EN MEDIOS FLUIDOS	41
EL ENTORNO MOLECULAR. INTERACCIONES SOLUTO-SOLVENTE	41
MEDIOS MICELARES	47
<i>INTRODUCCION</i>	47
<i>CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES</i>	47
<i>TECNICAS INSTRUMENTALES</i>	51
<i>UTILIDAD Y APLICACIONES DE LOS MEDIOS MICELARES</i>	57

COMPLEJOS DE INCLUSION	68
INTRODUCCION Y CLASIFICACION	68
EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR	71
Introducción	71
El reconocimiento molecular en sistemas biológicos	72
Reconocimiento molecular por moléculas pequeñas	73
<i>Eteres corona</i>	75
<i>Cavitandos</i>	75
<i>Ciclodextrinas</i>	77
CICLODEXTRINAS	78
Introducción	79
Origen y obtención de las ciclodextrinas	80
Nomenclatura	80
Generalidades estructurales y propiedades	81
<i>Estructura</i>	81
<i>Propiedades físicas y químicas en solución</i>	85
Naturaleza de las fuerzas de enlace en los complejos de inclusión con ciclodextrinas	89
Formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas	96
Métodos para la detección de la formación de los complejos de inclusión con ciclodextrinas	99
Introducción	99
Métodos de detección de complejos sólidos	100
<i>*Difractometría de rayos-X</i>	100
<i>*Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear</i>	100
<i>*Espectroscopia de absorción infrarroja</i>	100
<i>*Espectroscopia Raman</i>	101
<i>*Métodos térmicos</i>	101
Métodos de detección de complejos en medios líquidos	102
<i>*Métodos de variación de la solubilidad</i>	104
<i>*Métodos de difusión</i>	106
<i>*Métodos cinéticos</i>	107
<i>*Métodos instrumentales</i>	107
Selectividad de los complejos de inclusión con ciclodextrinas	130
Aplicaciones de las ciclodextrinas. Utilidad de los complejos de inclusión	137
<i>Aplicaciones farmacéuticas</i>	137
<i>Aplicaciones en catálisis química</i>	138
<i>Aplicaciones analíticas</i>	142
MATERIAL Y METODOS	151
APARATOS Y REACTIVOS	151
APARATOS	151
REACTIVOS	153
METODOLOGÍA	154
FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION	154
SEGUIMIENTO DE LA FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION	160
Espectrofotometría de absorción UV-VIS	160
Espectrofluorimetría	162

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	162
Espectrofotometría de absorción IR	163
Métodos térmicos	163
<i>ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS RETINOIDES TRAS LA FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION CON CD MEDIANTE HPLC. FOTOISOMERIZACION DE RETINOIDES</i>	<i>164</i>
<i>DETERMINACION CUANTITATIVA DE RETINOIDES</i>	<i>166</i>
RESULTADOS Y DISCUSION	167
FORMACION, DETECCION Y SEGUIMIENTO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION DE RETINOIDES CON CICLODEXTRINAS	167
<i>ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO Y ESPECTROFLUORIMETRICO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION. ESTUDIO PARALELO DE LA SOLUBILIZACION DE RETINOIDES EN MEDIOS MICELARES</i>	<i>167</i>
<i>Todo-trans retinal/ciclodextrinas</i>	<i>168</i>
<i>Retinal/β-CD</i>	<i>168</i>
<i>Retinal/HPβ-CD</i>	<i>178</i>
<i>Retinal/DMβ-CD y retinal/TMβ-CD</i>	<i>181</i>
<i>Retinal/α-CD</i>	<i>184</i>
<i>Retinal/γ-CD</i>	<i>189</i>
<i>13-cis retinal/ciclodextrinas</i>	<i>193</i>
<i>13-cis retinal/β-CD</i>	<i>193</i>
<i>13-cis retinal/HPβCD</i>	<i>193</i>
<i>13-cis retinal/DMβ-CD y TMβ-CD</i>	<i>196</i>
<i>13-cis retinal/α-CD</i>	<i>196</i>
<i>13-cis retinal/γ-CD</i>	<i>196</i>
<i>9-cis retinal/ciclodextrinas</i>	<i>200</i>
<i>9-cis retinal/β-CD</i>	<i>200</i>
<i>9-cis retinal/HPβ-CD</i>	<i>200</i>
<i>9-cis retinal/DMβ-CD y TMβ-CD</i>	<i>204</i>
<i>9-cis retinal/α-CD</i>	<i>207</i>
<i>9-cis retinal/γ-CD</i>	<i>209</i>
<i>Todo-trans acetato de retinilo/ciclodextrinas</i>	<i>209</i>
<i>Acetato de retinilo/β-CD</i>	<i>209</i>
<i>Acetato de retinilo/HPβ-CD</i>	<i>213</i>
<i>Acetato de retinilo/DMβ-CD y TMβ-CD</i>	<i>216</i>
<i>Acetato de retinilo/α-CD y γ-CD</i>	<i>220</i>
<i>Todo-trans retinol/ciclodextrinas</i>	<i>221</i>
<i>Retinol/β-CD</i>	<i>224</i>
<i>Retinol/HPβ-CD</i>	<i>227</i>
<i>Retinol/DMβ-CD y TMβ-CD</i>	<i>230</i>
<i>Retinol/α-CD y γ-CD</i>	<i>234</i>
<i>Todo-trans ácido retinoico/ciclodextrinas</i>	<i>234</i>
<i>Acido retinoico/β-CD</i>	<i>237</i>
<i>Acido retinoico/HPβ-CD</i>	<i>240</i>
<i>Acido retinoico/DMβ-CD y TMβ-CD</i>	<i>240</i>
<i>Todo-trans retinal/micelas</i>	<i>246</i>
<i>13-cis retinal/micelas</i>	<i>251</i>
<i>9-cis retinal/micelas</i>	<i>256</i>
<i>Acetato de retinilo/micelas</i>	<i>256</i>
<i>Retinol/micelas</i>	<i>265</i>
<i>Acido retinoico/micelas</i>	<i>270</i>

<i>ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION POR RMN</i>	273
¹ H-RMN de los complejos retinoide/cd obtenidos en solucion acuosa	273
¹ H-RMN del complejo aislado retinal/ β -CD	274
¹³ C-RMN del complejo aislado retinal/ β -CD	276
<i>ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION POR ESPECTROFOTOMETRIA DE</i> <i>ABSORCION INFRARROJA</i>	305
<i>ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION POR METODOS TERMICOS</i>	312
DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA Y LAS CONSTANTES DE ASOCIACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION DE RETINOIDES CON CICLODEXTRINAS	319
<i>ESTEQUIOMETRIA</i>	319
<i>CONSTANTES DE ASOCIACION</i>	330
VENTAJAS DERIVADAS DE LA FORMACION DE COMPLEJOS DE INCLUSION DE RETINOIDES CON CICLODEXTRINAS	343
<i>ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE FOTOISOMERIZACION DE RETINOIDES</i>	343
<i>DETERMINACION CUANTITATIVA DE RETINOIDES POR FORMACION DE</i> <i>COMPLEJOS DE INCLUSION</i>	363
 DISCUSION FINAL	373
 CONCLUSIONES	391
 BIBLIOGRAFIA	397

I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

I. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DE ESTA MEMORIA

A comienzos de los años 80 Turro y colaboradores, con una amplia experiencia en el campo de los medios micelares y de sus distintas aplicaciones, describen la utilidad que estos sistemas poseen desde el punto de vista de la protección a los estados excitados de las moléculas. Poco tiempo después el grupo de Cline Love puso de manifiesto las aplicaciones analíticas de los tensoactivos al observar fosforescencia a temperatura ambiente. De esta forma la fosforimetría, cuyas aplicaciones analíticas se habían visto limitadas y reducidas durante décadas debido, a la necesidad del empleo de nitrógeno líquido con la falta de reproducibilidad consiguiente, se presentó como una atractiva técnica instrumental gracias a las mejoras que aportaba la tecnología y que permitían la determinación cuantitativa de compuestos mediante técnicas de resolución temporal y sin necesidad del empleo de nitrógeno líquido ni fosforoscopios.

Poco tiempo después, y siguiendo en la misma línea de trabajo, este grupo de trabajo estudió el empleo de distintos tipos de ciclodextrinas, para observar fosforescencia a temperatura ambiente. Desde entonces, han aparecido numerosos trabajos acerca del empleo de ciclodextrinas y micelas, con el fin de observar fosforescencia a temperatura ambiente, o para mejorar la emisión fluorescente de numerosos compuestos gracias a la inclusión de los mismos en la cavidad de la ciclodextrina o en el agregado micelar. Igualmente ambos tipos de sustancias se han empleado como agentes solubilizantes en cromatografía líquida y para mejorar las características de sensibilidad en la detección luminiscente en HPLC. En esta línea de aplicación de las micelas y de las ciclodextrinas, gracias al incremento de la sensibilidad en la determinación luminiscente de compuestos orgánicos, nosotros nos planteamos la utilización de ambos medios.

Las ciclodextrinas son moléculas cíclicas, muy peculiares, constituidas por un número diferente de residuos de D-glucopiranos, unidos mediante enlaces α -(1-4) y que dan lugar a compuestos de estructura toroidal, capaces de alojar en el interior de sus cavidad a numerosos compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos. Existen tres tipos de ciclodextrinas naturales que son la α -, la β - y la γ -CD, formadas respectivamente por 6, 7 y 8 moléculas de glucopiranos. También se han obtenido las denominadas ciclodextrinas sustituidas, cuyos grupos -OH pueden encontrarse sustituidos por grupos metilo, acetato, hidroxipropilo, etc.. En el presente trabajo se describe el empleo de la α -, β - y γ -CD, así como el de la hidroxipropil- β -CD y de los análogos metilados de la β -CD.

Por otra parte, se han utilizado los medios micelares que inducen la solubilización de numerosos compuestos de carácter hidrofóbico gracias a la formación de agregados. En esta memoria se describe el empleo de distintos tipos de tensoactivos (aniónicos, catiónicos y no iónicos) con el fin de observar la luminiscencia a temperatura ambiente de las moléculas liposolubles estudiadas.

Los retinoides, entre los que se incluyen la vitamina A (retinol), el retinal y el ácido retinoico, son compuestos poliénicos que despiertan un gran interés, tanto debido a la singularidad de sus propiedades químicas y espectroscópicas, como desde el punto de vista biológico, debido al papel que desempeñan en el proceso fotoquímico de la visión (el retinal), en los procesos de división celular (ácido retinoico) o desde el punto de vista de la nutrición como vitamina esencial para el desarrollo (retinol).

Esta familia de compuestos o no muestra luminiscencia a temperatura ambiente (retinal, ácido retinoico) o bien presentan una débil emisión (retinol, acetato de retinilo). Por ello, uno de los objetivos de esta memoria ha sido la obtención de distintos complejos de inclusión con ciclodextrinas, que permitan mejorar esta emisión luminiscente y también su inclusión en el seno de medios micelares con el mismo objetivo. Por otro lado, dadas las peculiaridades observadas en el proceso de inclusión, nos planteamos, no sólo la mejora de la fluorescencia, sino el estudio de las características del complejo formado, de su estequiometría y de las constantes de asociación. Además, si los complejos formados son estables se podrá llevar a cabo la cuantificación de los distintos retinoides en solución acuosa, gracias a la solubilización de los mismos.

Por último, teniendo en cuenta las peculiaridades químicas, en cuanto a la isomerización *cis-trans* que se produce en el retinal que juega un papel fundamental en el proceso de la visión, definimos como uno de nuestro objetivos el estudio de dichos procesos de isomerización una vez formados los complejos de inclusión con las ciclodextrinas y micelas, con el fin de establecer si estos medios cuyo interior es hidrofóbico, pueden comportarse de un modo análogo a como se desarrollaría el proceso en los medios biológicos, en los que el entorno apolar lo proporciona la proteína correspondiente.

I. JUSTIFICATION ET OBJECTIFS DU MEMOIRE

Au début des années 80, Turro et ses collaborateurs, spécialistes des milieux micellaires, ont décrit l'intérêt de tels milieux dans la protection des molécules à l'état excité. Un peu plus tard, Cline Love et ses collaborateurs ont mis en évidence les applications analytiques des tensioactifs dans l'observation de la phosphorescence à température ambiante. C'est ainsi que la phosphorimétrie, technique très peu utilisée pendant des années, car nécessitant l'emploi d'azote liquide et manquant, donc, de reproductibilité, est devenue un instrument d'analyse très intéressant. La détermination quantitative des composés par des techniques de résolution temporaire est alors devenue possible, sans avoir recours à l'azote liquide, ni aux phosphoroscopes.

Peu de temps après et dans la même ligne de recherche, ce même groupe a étudié l'emploi de différents types de cyclodextrines pour observer la phosphorescence à température ambiante. Depuis, de nombreuses publications sont parues sur l'observation de la phosphorescence à température ambiante ainsi que sur l'amélioration de la fluorescence de nombreuses molécules au moyen de leur inclusion dans la cavité des cyclodextrines ou à l'intérieur des micelles. Le même procédé a également été utilisé en chromatographie liquide, pour permettre la solubilisation, et, en HPLC, pour améliorer la sensibilité de la détection lumineuse. C'est dans le but d'accroître la sensibilité de la détermination lumineuse que nous nous sommes intéressés aux cyclodextrines et aux micelles.

Les cyclodextrines sont des molécules cycliques très particulières constituées par un nombre variable d'unités de D-glucopyranose, reliées entre elles par des liaisons α -(1-4), qui donnent lieu à des composés de structure toroïdale, capables de loger de nombreux composés, organiques comme inorganiques, à l'intérieur de leur cavité. Il existe trois types de cyclodextrines naturelles: α -, β - et γ -CD formées respectivement de 6, 7 et 8 molécules de glucopyranose. Des cyclodextrines substituées peuvent être obtenues par le remplacement des groupes hydroxyles par des groupes méthyles, acétyles, hydroxypropyles, etc... Dans ce travail les utilisations de la α -, la β - et la γ -CD sont

décrites, de même que celles de l'hydroxypropyl- β -CD et des analogues méthylés de la β -CD.

Nous avons, d'autre part, travaillé sur les milieux micellaires, milieux capables de solubiliser de nombreux composés hydrophobes par formation d'agrégats. Au cours de ce travail, différents tensioactifs (anioniques, cationiques et non-ioniques) ont été employés afin de pouvoir observer la luminescence des molécules liposolubles étudiées à température ambiante.

Les rétinoïdes, parmi lesquels se trouvent le rétinol (vitamine A), le rétinal et l'acide rétinoïque, sont des composés polyéniques à propriétés chimiques et spectroscopiques particulières. Ils sont primordiaux d'un point de vue biologique, dans le processus photochimique de la vision (le rétinal) et dans la division cellulaire (l'acide rétinoïque), et, d'un point de vue nutritionnel, en tant que vitamine essentielle pour le développement (le rétinol).

Les composés de cette famille ne donnent pas de luminescence à température ambiante (cas du rétinal et de l'acide rétinoïque) ou ne présentent qu'une faible émission (cas du rétinol et de l'acétate de rétinyle). Ainsi, l'un des objectifs de ce travail était d'améliorer l'émission lumineuse par l'obtention de complexes d'inclusion avec les cyclodextrines ainsi que par l'inclusion dans des milieux micellaires. D'autre part, nous avons étudié les caractéristiques des complexes formés, leur stoechiométrie et leurs constantes d'association. En effet, la formation de complexes stables permettrait une quantification des différents rétinoïdes en solution aqueuse grâce à leur solubilisation.

Enfin, à cause des particularités chimiques de l'isomérisation *cis-trans* du rétinal, molécule au rôle capital dans le processus de la vision, nous nous sommes attachés à étudier la photoisomérisation, après formation de complexes d'inclusion avec les cyclodextrines et les solutions micellaires, afin d'établir si de tels milieux, hydrophobes à l'intérieur, se comportent de façon analogue aux milieux biologiques où c'est une protéine qui est responsable de l'environnement apolaire.

II. PARTE TEORICA

II.A RETINOIDES

II.A.1 PAPEL BIOLOGICO DE LOS RETINOIDES

Las sustancias con actividad vitamínica A, son aquellos compuestos, distintos de los carotenoides que poseen cualitativamente la actividad biológica del retinol (vitamina A). El término retinoide es un término general que incluye tanto a los compuestos naturales con actividad de vitamina A, como a los análogos sintéticos del retinol, ya sean con o sin actividad biológica. Por tanto, cuando hablemos de "retinoides" a lo largo de esta memoria, nos referiremos a la familia de moléculas que incluyen al retinol, el retinal (retinaldehído), el ácido retinoico y sus análogos sintéticos (FIGURA 1).

En un principio la importancia de estas moléculas se centró en las áreas de la visión y de la nutrición, pero en la actualidad se ha extendido el interés que presenta la biología y la química de estas moléculas a áreas más amplias de la investigación biológica y médica. Se sabe que los retinoides son mediadores fundamentales tanto de la diferenciación como de la proliferación celular, y parece que pueden jugar un papel importante en clínica, como ocurre con los esteroides. A pesar de que el problema del mecanismo molecular de la acción de los retinoides en el control de la proliferación y de la diferenciación celular permanece aún sin resolver, existe abundante bibliografía sobre este tema .

Debido al importante desarrollo de nuevos retinoides para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades, particularmente en las áreas de oncología y dermatología, ha habido un incremento notable en la investigación de la toxicología de los retinoides y de su interacción con el sistema inmunológico. El desarrollo de las técnicas de cultivo celular ha facilitado el estudio de los efectos de los retinoides a nivel celular. Una conclusión fundamental de estos estudios es la de que los retinoides son agentes muy potentes en el control de la diferenciación y la proliferación celular. En este sentido han jugado un papel particularmente notable ayudando a comprender el problema de la diferenciación de las células malignas. La capacidad de los retinoides para detener la progresión de las células premalignas o de inducir la diferenciación terminal de las células malignas, ha influido de forma notable en el campo de la investigación del cáncer y hace concebir la esperanza de encontrar nuevas modalidades de prevención y tratamiento del mismo, que puedan remplazar el uso de sustancias altamente citotóxicas a los enfermos.

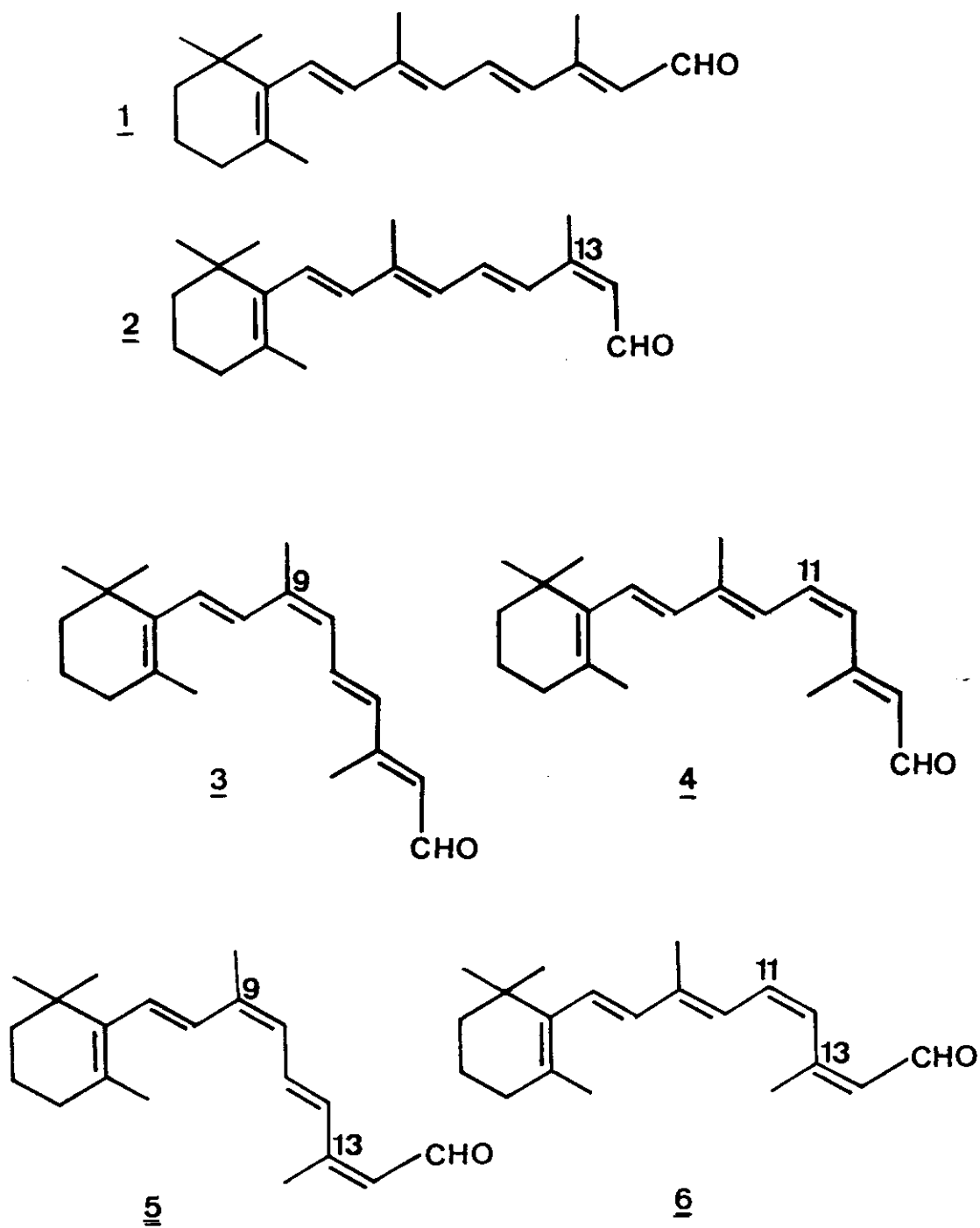


FIGURA 1: Estructura química de los isómeros geométricos del retinal. 1: todo-trans retinal, 2: 13-cis retinal, 3: 9-cis retinal, 4: 11-cis retinal, 5: 9,13-dicis retinal, 6: 11,13-dicis retinal.

Por otro lado, se han conseguido éxitos clínicos con estas moléculas en el tratamiento de determinadas enfermedades de la piel, que anteriormente eran refractarias a otro tipo de terapia.

II.A.2 NOMENCLATURA

En 1982, la IUPAC-IUB dió una serie de reglas para la nomenclatura de la vitamina A y sus derivados, que son las que se utilizarán a lo largo de esta memoria. Las estructuras básicas se conocen con los nombres de retinol, retinaldehído, (corrientemente llamado retinal) y ácido retinoico; estos nombres hacen siempre referencia a los compuestos todo-*trans*.

Para numerar los átomos de carbono de los retinoides naturales (retinol, retinal y ácido retinoico) así como los de los compuestos cuyos esqueletos carbonados deriven de estos tres, los Chemical Abstracts han utilizado el esquema que ha seguido la IUPAC para los carotenoides (FIGURA 2). De acuerdo con este esquema numérico se pueden nombrar los isómeros geométricos o los compuestos sustituidos de forma clara y sencilla, por ejemplo ácido 13-*cis* retinoico o 3-hidroxi-retinol (FIGURAS 3 y 4).

Sin embargo, para nombrar los retinoides de forma sistemática hay que usar un esquema de numeración diferente y considerar al átomo de carbono unido al grupo funcional como el carbono 1. El nombre sistemático para el retinol sería por lo tanto todo *trans* 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)-nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol.

Los derivados del retinol se nombran como derivados de retinilo, por ejemplo acetato de retinilo o retinilamina. Los derivados del ácido retinoico se nombran como derivados del ácido carboxílico, e.g., retinoato de etilo o N-etilretinamida. Los compuestos derivados del retinal se nombran como derivados aldehídicos o como compuestos sustituidos por el extremo retilidénico bivalente, e.g., retinal oxima o N-retinilideno-1-aminopropan-2-ol.

Merecen una especial atención los retinoides que poseen sustituyentes adicionales en la cadena lateral olefínica. Si comparamos la designación estereoquímica del todo-*trans* retinoato de etilo con la misma molécula que se encuentra sustituida en la posición 10 por

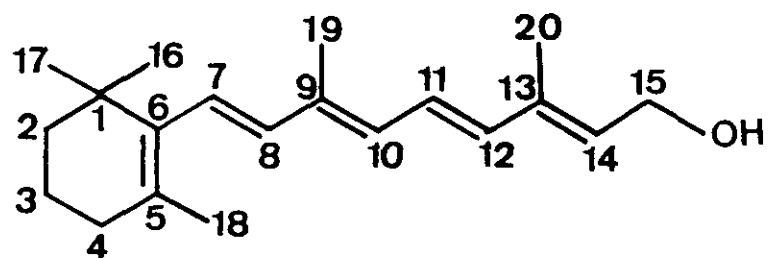


FIGURA 2: Estructura química del retinol. Numeración asignada según recomendación de la IUPAC.

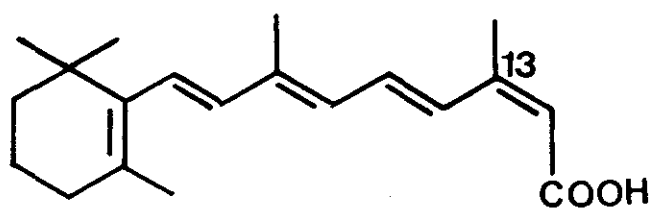


FIGURA 3: Ácido 13-cis retinoico.

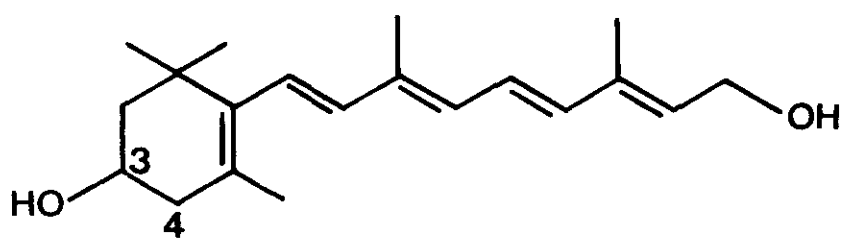


FIGURA 4: 3-hidroxi-retinol.

un átomo de fluor, debido a la prioridad de los sustituyentes en los dobles enlaces, el prefijo estereoquímico debe cambiarse de *trans* a *cis*, a pesar de que la configuración de la cadena lateral tetraénica permanezca inalterada (FIGURAS 5 y 6).

II.A.3 CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS Y ESPECTROSCOPICAS

Cuando se registran los espectros de absorción y emisión de una determinada molécula, los picos que se pueden observar están relacionados con las transiciones entre los niveles energéticos de la misma. Sin embargo, no todas las transiciones entre niveles pueden tener lugar. Existen una serie de transiciones que están "prohibidas" por unas reglas de selección, algunas de las cuales están estrechamente relacionadas con las características de simetría de la molécula. Un ejemplo claro lo tenemos en el caso de las transiciones entre niveles electrónicos, donde el comportamiento simétrico del momento dipolar se puede utilizar para deducir las reglas de selección.

En cualquier caso, la influencia de la simetría de la molécula en los niveles energéticos es un hecho experimental; una molécula muy simétrica tendrá sus niveles energéticos muy definidos, con determinadas transiciones prohibidas por las reglas de selección. Sin embargo, para sistemas de simetría más baja (como en el caso de los aldehídos poliénicos, si se compara con los polienos), prácticamente todas las transiciones llegan a estar permitidas, aunque sea débilmente. Las características de simetría de una molécula se ponen de manifiesto al someterlas a ciertas operaciones (de simetría), lo que implica que después de haber efectuado dicha operación de simetría la molécula es indistinguible de la molécula original. Entre estas operaciones podemos citar:

1. C_n : Rotación ($2\pi/n$) radianes alrededor del eje principal de simetría.
2. σ_v : Reflexión respecto a un plano que contenga al eje principal.
3. Reflexión respecto a un plano normal al eje principal.
4. Inversión: cualquier punto se transforma en su imagen a través del origen.
5. Operación identidad E que deja inalterada la molécula.

Por ejemplo, moléculas como F_2 , Cl_2 o H_2 poseen un eje de simetría de tipo C_2 (el eje de la molécula), además de que cualquier plano que contenga ese eje, es un plano σ_v . Asimismo, la molécula del tipo BCl_3 tiene un eje C_3 además de que el plano de la molécula es del tipo σ_h . Por muy complicada que sea una molécula existen solamente treinta y dos combinaciones o grupos diferentes de elementos de simetría. Nosotros haremos referencia únicamente a los que se denotan por C_{2h} (con elementos de simetría E , C_2 , σ_h , i) y C_{2v} (con elementos de simetría E , C_2 , $2\sigma_v$) al ser los más relacionados con las moléculas estudiadas en esta memoria.

Es importante señalar que las funciones de onda de los orbitales moleculares (combinaciones lineales de las funciones de onda de los átomos que las componen) pueden ser simétricas (no cambian de signo) o antisimétricas (cambian de signo) frente a las operaciones de simetría de la molécula. Estas funciones de onda reciben una notación dada según sean sus características:

- A o B indican que la función tiene respectivamente signo $+1$ (es simétrica) ó -1 (es antisimétrica) frente a un elemento del tipo C_n alrededor del eje principal.
- El índice 1 ó 2 indica $+1$ ó -1 frente a un operador σ_v (para los grupos C_{nv}).
- El subíndice g ó u indica $+1$ o -1 frente a la inversión i .
- Cuando frente a una operación del tipo σ_h la función es simétrica ($+1$) o antisimétrica (-1), se indica mediante el signo $+$ ó $-$ respectivamente.

Para los compuestos de tipo poliénico se habla en la bibliografía de simetría de tipo C_{2h} [1988 PP 369]. Se sabe que el estado fundamental es del tipo A_g mientras que existen cuatro estados monoexcitados, dos de ellos de tipo B_u y dos de tipo A_g . Las reglas de selección indican que las únicas transiciones permitidas son las que se producen desde el estado fundamental hacia estados B_u . Si se redujera la simetría de la molécula, por ejemplo de C_{2h} a C_{2v} , habría más transiciones permitidas como ya se comentó anteriormente. Además, si se incluyeran procesos de absorción de dos fotones, las reglas de selección permitirían transiciones de tipo $g \rightarrow g$ o $u \rightarrow u$, aunque este tipo de transición no se observa normalmente.

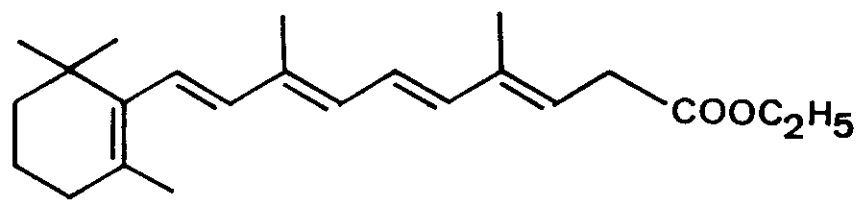


FIGURA 5: Retinoato de etilo o éster etílico del ácido retinoico.

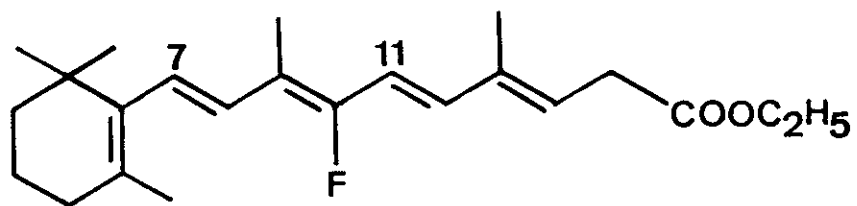


FIGURA 6: 9-cis 10 fluororetinoato de etilo.



FIGURA 7: Confórmeros del retinal: (1) 6-s-cis, (2) 6-s-trans.

Finalmente comentaremos otro aspecto de cara a la nomenclatura que se utiliza normalmente en la bibliografía. En ella se suele emplear la notación característica del grupo de simetría C_{2h} para los derivados de retinal, aunque no pertenezcan a este grupo (de hecho su simetría es inferior). Esto es así debido a que a pesar de haberse reducido mucho la simetría geométrica, no lo ha hecho en el mismo grado la simetría electrónica, esto es la correspondiente a las funciones de onda. Como las transiciones se producen entre estados electrónicos, ocurre que sus espectros "guardan memoria" de la simetría original. Es por ello que cuando se habla de estados A_g o B_u , nos estamos realmente refiriendo a estados que son de tipo A_g o B_u .

II.A.3.1 CARACTERISTICAS ESPECTROSCOPICAS DE LOS POLIENOS Y LOS RETINALES

Antes de comenzar a hablar de los retinales, vamos a comentar brevemente algunas características de los polienos. Según Zechmeister [1962 L I] los polienos de cadena larga exhiben un comportamiento constante con respecto a la intensidad y la posición de sus tres bandas de absorción principales.

La banda principal (banda I) correspondería a una transición del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ desde un estado $1A_g$ a un estado $1B_u^*$. Esta banda tiene como características el que se desplaza hacia el rojo al aumentar la longitud de la cadena y que es más intensa en los isómeros *trans*, viéndose debilitada cuando existen enlaces *cis* en la cadena [1980 JACS 488]. En los retinales, esta banda es ancha y sin estructura, tanto a 77 K como a temperatura ambiente. Ello se debería a la interacción entre el anillo β -ionolideno y la cadena poliénica, con la consiguiente torsión alrededor del enlace $C_6 - C_7$, siendo los responsables por tanto los conformeros 6-*s-cis* [1978 JPC 2081].

La banda II es la que presenta mayor dificultad en su asignación espectroscópica. En los polienos esta banda tiene como características el que se solapa ostensiblemente con la banda I, disminuyendo en intensidad conforme aumenta el número de dobles enlaces de la cadena poliénica y presentando estructura fina a baja temperatura. Todos los autores parecen estar de acuerdo en esto y en el hecho de que es más intensa en los isómeros *cis*. Las discrepancias aparecen fundamentalmente a la hora de atribuirle una asignación espectroscópica.

Para algunos autores como Becker y Das [1978 JPC 2081], esta banda provendría de una absorción $1A_g \rightarrow 1B_u$ y los confórmeros 6-s-*trans* presentes en la solución en un 10% serían los responsables de su aparición (FIGURA 7). Sin embargo para Honig y Dinur [1980 JACS 488] a la banda a 280 nm (banda β) que es a la que Zscheimeister denomina pico *cis*, le correspondería una transición de tipo $1A_g \rightarrow 1A_g^+$ ya que gana en intensidad a partir del estado A_g^+ . Para otros autores como Birge y col. [1975 CPL 451], la banda a 280 nm correspondería a una transición de tipo $n \rightarrow \pi^*$, aunque esta opinión no parece ser compartida por nadie más. Lo que si parece estar claro es el hecho de que exista estructura fina en esta banda β proviene de los confórmeros *cis* casi planos.

Las discrepancias que surgen en torno a la banda β se reflejan en la falta de acuerdo que existe cuando se habla de la banda γ , que es la menos intensa de las tres. Esta banda es en general débil y está mal definida en los isómeros *trans* de los polienos, aunque se distingue bien y es relativamente intensa en los isómeros *cis*, principalmente en los terminales como el 13-*cis*. La banda a 280 nm es sin embargo más intensa cuando los dobles enlaces son centrales. Para Becker y Das, esta banda corresponde al pico *cis*, es decir proviene de una transición del tipo $1A_g \rightarrow 1A_g^+$, aunque para Dinur y col. [1980 JACS 488] la asignación de la banda γ es una cuestión que aún permanece sin resolver, no atreviéndose a asignarle ningún tipo de transición.

En definitiva, se puede decir que en los espectros de absorción, el estado más bajo responsable de las transiciones de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ puede cambiar su orden de energía en función de :

1. La longitud de la cadena.
2. La naturaleza del isómero geométrico y del confórmero para una misma longitud de cadena.
3. La protonación o no del nitrógeno en el caso de la base de Schiff.

Además existe un estado (n, π^*) para cualquier derivado que contenga átomos con electrones no enlazantes tales como aldehído, cetona y bases de Schiff. El estado (n, π^*) puede ser de mayor o menor energía que el estado (π, π^*), hecho que depende

fundamentalmente de la longitud de la cadena poliénica y en menor medida de la naturaleza del isómero geométrico. Para Das y Becker, la intensidad del estado excitado más bajo resulta sin embargo demasiado elevada como para que le corresponda una transición del tipo $n \rightarrow \pi^*$.

II.A.3.2 CARACTERISTICAS DE EMISION EN LOS RETINALES

Las características de emisión de los retinales han sido estudiadas principalmente por Becker y col. [1976 JPC 2265]. El estado singulete más bajo en los retinales secos en solventes tipo alcano seco es probablemente un estado de carácter (n, π^*) . En estos trabajos, los resultados más importantes indican que no se observa fluorescencia para el todo-*trans* retinal y el 13-*cis* retinal a concentraciones bajas en condiciones secas cuando el solvente es de tipo aprótico, hecho que se produce para cualquier temperatura. Cuando se observa fluorescencia para este tipo de compuestos existen por tanto dos posibilidades:

- Que ésta sea debida a las especies que se encuentran unidas por puentes de hidrógeno.
- O debido a que se pueden formar dímeros, en el caso de los retinales secos en solventes secos cuando la concentración es lo suficientemente alta.

En este último caso, el comportamiento es distinto del de las especies unidas mediante puentes de hidrógeno y se cree que la fluorescencia se debe entonces a la formación de dímeros. La formación de dímeros podría causar un cambio en la naturaleza del estado singulete más bajo con la consiguiente aparición de fluorescencia. Este hecho podría ser explicar la dependencia adicional del rendimiento cuántico de fluorescencia aparente que se produce al variar la longitud de onda, lo que se refleja en la falta de concordancia entre el espectro de excitación y el de absorción.

Normalmente ninguno de los isómeros geométricos del retinal muestra fluorescencia o fosforescencia a 298 K en solventes secos hidrocarbonados a concentraciones del orden de 5×10^{-5} M [1973 JACS 8223] [1976 JPC 2265] [1976 JACS 7099] [1978 JACS 2626]. Si se disminuye la temperatura en presencia de un disolvente capaz de formar enlaces por puentes de hidrógeno, el rendimiento cuántico de fluorescencia se incrementa de forma

considerable [1979 JACS 3283]. En este caso hay además una dependencia importante de la fluorescencia con la longitud de onda de excitación. Se ha visto que este hecho se debe a la coexistencia del retinal unido mediante puentes de hidrógeno y del retinal libre y no emisor. El retinal libre (no unido por enlaces por puentes de hidrógeno) tendría como estado más bajo un estado de tipo (n,π^*) no siendo por tanto fluorescente, mientras que el retinal unido por puentes de hidrógeno tendría como estado singulete más bajo un estado (π,π^*) y sería fluorescente (FIGURA 8).

El rendimiento cuántico de fotoisomerización ϕ_{pi} de los retinales varía de forma significativa con el disolvente (si es capaz o no de formar enlaces por puentes de hidrógeno) y puede ser hasta ocho veces menor en metanol que en un hidrocarburo [1976 JACS 4189]. El etanol parece ser un tanto especial ya que ϕ_{pi} es hasta tres veces mayor que en un hidrocarburo (y unas 50 veces mayor que en metanol) [1981 JACS 7389]. La distribución de los isómeros y su ϕ_{pi} (rendimiento cuántico de fotoisomerización) puede variar de forma significativa con el disolvente [1970 PP 249].

II.A.3.3 CARACTERISTICAS DE EMISION DE OTROS RETINOIDES

Tanto el retinol como el acetato de retinilo son sustancias fluorescentes. Ya en 1969, Thompson indicó que la mayoría de los isómeros del retinol muestran fluorescencia a temperatura ambiente (rendimiento cuántico de fluorescencia $\phi_f \approx 0.01$), la cual se incrementa unas veinte veces a 77 K para el todo-*trans* retinol y el acetato de retinilo. En metanol ϕ_f disminuye aproximadamente dos a tres veces si se compara con un solvente hidrocarbonado. Posteriormente se ha calculado el valor de ϕ_f para el todo-*trans* retinol y el éter de retinilo en distintos solventes y en función de la temperatura, confirmándose que el valor de ϕ_f a temperatura ambiente para el todo-*trans* retinol es de 0.02-0.03 y de 0.02 para el éter. Sin embargo aunque a baja temperatura (77 K) ϕ_f aumente sustancialmente para ambos compuestos, el incremento es mayor para el éter que para el alcohol (20 veces frente a 13). La adición de un donador de protones (como por ejemplo un alcohol) o de un solvente aceptor (como los éteres y las aminas) o bien no afecta al valor de ϕ_f a temperatura ambiente o puede producir un aumento de hasta un 60% en su valor. A 77 K pueden obtenerse valores aún mayores ($\phi_f = 0.54$) [1980 PP 739] [1979 PP 1001].

Ya que el proceso de fotoisomerización es un proceso que compite con la luminiscencia, se han llevado a cabo estudios para calcular el rendimiento cuántico de fotoisomerización (ϕ_{pi}) de estas moléculas. El rendimiento cuántico de fotoisomerización del todo-*trans* retinol a temperatura ambiente, si suponemos que se forma el isómero 11-*cis*, es de 0'011 en hexano y 0'15 en metanol. Se cree que el aumento de ϕ_{pi} en solventes polares se debe a que se produce un radical libre o un ion R^+ para el cual se logra una mayor isomerización, produciéndose por tanto más isómero 11-*cis* [1976 L II].

Según Takemura [1980 JACS 2604], tanto los isómeros 9-*cis* y 13-*cis* como todo-*trans* del ácido retinoico muestran valores elevados de ϕ_f (0'2-0'6) a 77 K en solventes de tipo alcano. Los rendimientos cuánticos serían más altos que para los retinoles y mucho más que para el retinal y las bases de Schiff y no muestran dependencia con la temperatura [1973 JACS 8223] [1979 PP 1001]. Sin embargo es muy significativo el hecho de que no se puede detectar fluorescencia para el ácido retinoico ni para el todo-*trans* retinoato de metilo a temperatura ambiente ($\phi_f \leq 10^{-4}$). Estos resultados son comparables a los que se obtienen para los retinales y las bases de Schiff, mientras que en el caso del retinol y el éter, estos muestran fluorescencia a temperatura ambiente como ya indicamos anteriormente.

No está demasiado clara la naturaleza de la emisión que se produce en este tipo de moléculas, es decir si se trata de fluorescencia o de fosforescencia. En el caso del ácido retinoico y sus ésteres, no se ha observado fosforescencia a ninguna temperatura (al menos hasta -100°C) y en ningún tipo de solvente o mezcla de ellos. Datos obtenidos mediante fuentes de radiación de láser pulsante indican que los estados singlete y triplete, ya sean de carácter (n, π^*) como (π, π^*), que se encuentran implicados en el cruce de sistemas eficaz en los retinales y otros aldehídos y cetonas de tipo poliénico, se encuentran localizados a energías demasiado altas como para estar involucrados en un cruce de sistemas en el caso de los distintos isómeros del ácido retinoico y los retinoatos.

Finalmente es importante comentar que tanto en el caso del retinol como del ácido retinoico se pueden formar dímeros. En el caso del ácido retinoico se forman puentes de hidrógeno intermoleculares que afectan al oxígeno del grupo carbonilo que se encuentra conjugado con la cadena poliénica (I). En ambos casos puede haber enlaces por puentes de hidrógeno que afecten al grupo carboxílico que no está conjugado con la cadena (II)

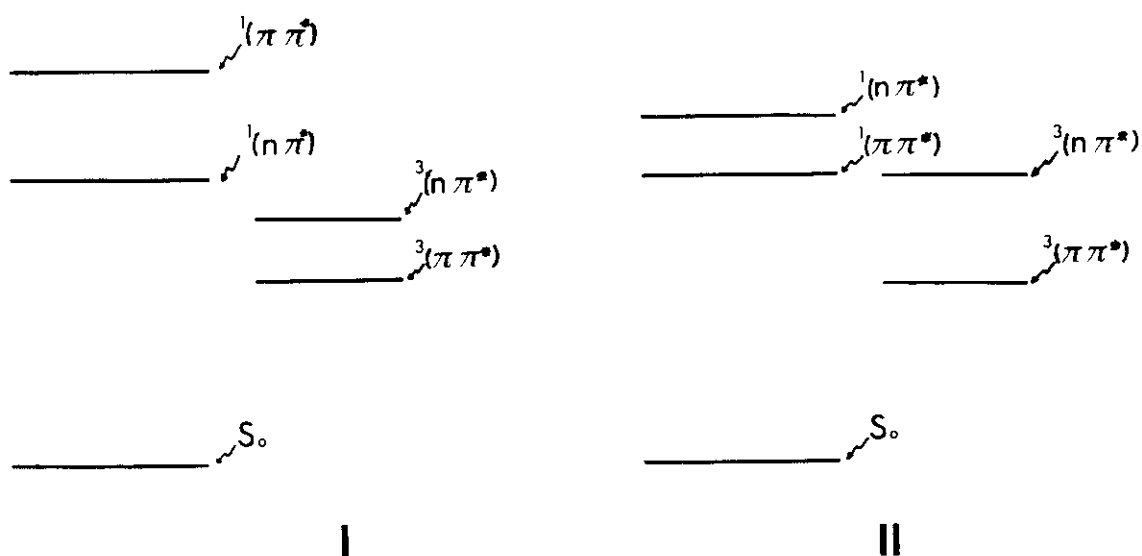


FIGURA 8: Localización de los estados energéticos en los aldehidos poliénicos según la naturaleza del solvente: (I) solvente hidrocarbonado, (II) solvente capaz de formar enlaces por puentes de hidrógeno.

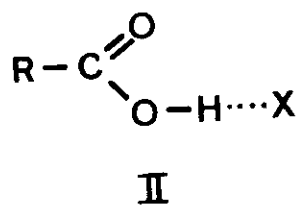
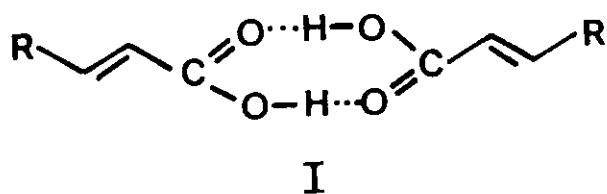


FIGURA 9: Formación de dímeros a través de la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares de ácido retinoico (I). Formación de puentes de hidrógeno entre el ácido retinoico y solventes (diéteres, aminas) (II).

(FIGURA 9). Para el ácido retinoico los dímeros pueden existir en solventes tipo alcano hasta en una proporción de aproximadamente el 50%, mientras que en solventes de tipo alcohol fundamentalmente lo que existe es el monómero, como ocurre en general para el retinol a temperatura ambiente. A 77 K, en ambos casos lo predominan los dímeros.

II.A.4 TECNICAS INSTRUMENTALES EN EL ESTUDIO DE RETINOIDES

Desde el punto de vista de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), se ha publicado un gran número de espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los isómeros de los retinoides, tanto naturales como sintéticos [1979 IJVNR 347] [1979 JC 113], lo cual hace posible en la mayoría de los casos el poder determinar la configuración de una nueva molécula perteneciente a esta familia. En la síntesis de nuevos retinoides se utiliza de forma rutinaria un espectro RMN para establecer de modo concluyente la estructura del compuesto realmente sintetizado [1981 HCA 2746].

La espectroscopia ^{13}C -RMN es un método espectroscópico excelente para la determinación rápida y precisa del ordenamiento estérico en retinoides y carotenoides. Cada incremento en la interacción estérica (por ejemplo en el caso de moléculas que poseen una configuración *cis*) causa un desplazamiento de la señal correspondiente hacia campo más alto, mientras que una disminución del impedimento estérico produce una señal hacia campo más bajo.

Mediante espectroscopia ^1H -RMN ha sido posible demostrar que las cadenas tetraénicas del todo-*trans* retinal, y de los isómeros 9-*cis* y 13-*cis* adoptan en solución una conformación plana *s-trans* a lo largo de toda la cadena [1969 N 825] [1975 JACS 1023]. Por otro lado, el 11-*cis* retinal es plano únicamente en las regiones comprendidas entre los carbonos C_7 al C_{14} y del C_{13} al C_{15} . En solución, los dos confórmeros 12-*s-cis* y 12-*s-trans*, están en equilibrio y sus energías difieren en menos de 1 kcal/mol. Las bajas temperaturas favorecen el confórmero 12-*s-trans*.

Desde el punto de vista de la espectroscopia de absorción ultravioleta-visible podemos señalar que el coeficiente de absorción molar para el 11-*cis* retinal es relativamente bajo por lo que ha sido objeto de numerosas investigaciones. El equilibrio en solución entre la conformación 12-*s-cis* y la 12-*s-trans*, más estable, depende de la

temperatura y del disolvente empleado. Ambas conformaciones se encuentran bastante giradas por lo que resulta difícil aplicar reglas simples para llevar a cabo las asignaciones espectroscópicas en el caso de este isómero.

Asimismo hay que señalar que el 9,11,13-*tricis* y el 11,13-*dicis* retinal absorben a longitudes de onda cortas debido a que estas moléculas poseen sistemas de dobles enlaces con un alto grado de torsión. Las intensidades relativas de la banda α , que es normalmente la más intensa en el caso de los retinales y de la banda β más débil, se encuentran invertidas en el caso de los isómeros 11,13-*dicis* y 9,11,13-*tricis*. Esto indica que estos dos aldehídos existen predominantemente en una configuración 12-*s-cis*, y que la existencia de una banda β intensa es característica de esta conformación [1980 JACS 6355] [1983 JACS 1626].

Las propiedades fluorescentes del retinol y los alcoholes poliénicos ha sido objeto de un estudio intensivo y su importancia en el análisis de los retinoides se ha discutido en artículos de revisión [1971 L IIIa] [1980 AP 97]. Los métodos analíticos para la determinación de la vitamina A se basan en las propiedades fluorescentes del retinol. La fluorescencia del retinol a 295 K se caracteriza fundamentalmente por dos hechos:

- No existe una relación de imagen especular entre el espectro de absorción y el de emisión de fluorescencia [1969 JCP 4106].
- Existe discrepancia entre la constante de velocidad de emisión y el rendimiento cuántico de fluorescencia.

No está claro la razón por la cual el rendimiento cuántico del retinol se incrementa ostensiblemente (factor de 10) cuando se desciende la temperatura hasta 77 K [1969 JCP 4106] [1973 JACS 8223] [1976 JPC 2265].

Los espectros de absorción infrarroja (IR) del retinol y del ácido retinoico en disolventes no polares indican que estos compuestos forman agregados moleculares como resultado de la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares [1980 PP 739]. Parece ser que el retinal no sufre este tipo de asociación molecular en disolventes no polares a temperatura ambiente [1980 JACS 2963].

En cuanto a la espectrometría de masas, apenas se ha utilizado como método analítico en la síntesis de nuevos retinoides, ya que los espectros de los isómeros geométricos son idénticos en algunos casos, como ocurre por ejemplo con el 9-*cis* y el 13-*cis* retinal o de los derivados sililados del retinol [1967 HCA 1243].

El ácido retinoico todo-*trans* cristaliza en distintas formas polimórficas y se ha llevado a cabo el análisis de su estructura por difractometría de rayos-X tanto de la modificación monoclinica metaestable como de la modificación triclinica estable [1963 ACry 62] [1978 CW 78]. A aproximadamente 80°C se produce una transición irreversible desde la modificación monoclinica a la triclinica. Las estructuras cristalinas de las dos modificaciones difieren en particular en la región del enlace C₆ y C₇, en el ordenamiento estérico relativo del anillo de ciclohexeno y la cadena lateral. La forma monoclinica tiene una configuración *s-trans* casi plana alrededor del enlace C₆—C₇, con una desviación angular de sólo 6° entre la cadena lateral y el doble enlace del anillo [1971 ACSB 667]. Las moléculas en los cristales de la modificación triclinica tienen una conformación tipo *cis*, no plana alrededor del enlace sencillo C₆—C₇. La cadena tetraénica es casi plana y forma un ángulo de unos 35° con el doble enlace de los carbonos C₅ y C₆ del anillo.

Debe tenerse en cuenta que las fuerzas de empaquetamiento influyen en las conformaciones de las estructuras cristalinas de estos compuestos. La conformación real de un retinoide en solución puede por lo tanto diferir de la estructura geométrica que se ha determinado mediante análisis por rayos-X. Para una única molécula aislada de retinal, se han calculado las estabilidades relativas de las conformaciones *s-cis* y *s-trans* alrededor del enlace sencillo C₆-C₇. Los cálculos indican que la conformación *s-cis*, en la cual el ángulo entre el plano del doble enlace del anillo y el plano de la cadena lateral es de 40°, es la más estable. A pesar de que la conformación plana *s-trans* también muestra un mínimo de energía, esta conformación es menos estable, en aproximadamente 2'5 kcal/mol.

El ángulo de torsión del anillo en el 11-*cis* retinal presenta un ángulo de unos 40° alrededor del enlace C₆-C₇. El segmento de cadena comprendido entre los átomos C₆ y C₁₂ es básicamente plano. El ángulo de torsión entre los carbonos C₁₂ y C₁₃ difiere de una conformación *s-cis* en unos 39° y los dobles enlaces entre los carbonos C₁₃ y C₁₄ y entre el carbono C₁₅ y el O no son paralelos al resto de la cadena olefínica [1971 N 558].

Asimismo se han determinado las estructuras cristalinas de los confórmers 6-s-*cis* y 6-s-*trans* del 13-*cis* retinal [1981 ACSB 2197] [1980 B 4589]. En el confórmer 6-s-*trans* el doble enlace del anillo de ciclohexeno está casi en el plano de la cadena poliénica, mientras que en el confórmer 6-s-*cis* el anillo sufre una rotación de 110° sobre esta orientación. Parece ser que en esta orientación se producen interacciones estéricas mayores y que aparentemente son compensadas por una estabilización de resonancia mejor. Ambas formas coexisten en el cristal.

El gran desarrollo que ha tenido la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en los últimos años, ha demostrado que esta técnica es una herramienta analítica excelente para la separación de mezclas complejas de retinoides [1973 JC 447] [1979 JLC 1097]. Una ventaja añadida del HPLC sobre la cromatografía en columna o en capa delgada es que se pueden eliminar el oxígeno atmosférico así como la luz de manera muy sencilla durante el proceso de separación. Además de la identificación analítica de los isómeros de los retinoides [1982 L IVb], esta técnica cromatográfica se ha desarrollado también a escala preparativa [1979 JLC 1097].

Mediante esta técnica cromatográfica se han conseguido aislar un gran número de retinoides (particularmente los derivados del retinal) que no pueden obtenerse de forma suficientemente pura usando otros métodos. Por ejemplo, el todo-*trans* retinoato de metilo disuelto en heptano, acetonitrilo o dimetil sulfóxido puede isomerizarse mediante su exposición a luz visible y se han conseguido purificar 11 isómeros de la mezcla mediante HPLC preparativa [1978 JC 379] [1979 JC 113] [1979 IJVNR 347]. Otros trabajos similares [1980 JC 395] [1981 CPB 3385] han demostrado la alta eficacia del uso combinado de la isomerización fotoquímica y el HPLC, aunque este método generalmente proporciona cantidades de sustancia relativamente pequeña.

II.A.5 PROPIEDADES QUÍMICAS: REACCIONES DE LOS RETINOIDES

II.A.5.1 REACCIONES DE LA CADENA LATERAL

Los retinoides de tipo *cis* pueden isomerizarse para dar los correspondientes isómeros *trans* mediante la acción catalítica del yodo [1973 GCI 117] [1973 CIT 646].

La reacción de Carr-Price se basa en los cationes coloreados que se forman vía cloruro de antimonio(III) [1982 L IVa]. Del mismo modo, se ha utilizado en análisis colorimétrico la protonación de retinoides con ácido trifluoroacético.

II.A.5.2 REACCIONES DE ADICIÓN Y OXIDACIÓN

Las reacciones de adición en el sistema poliénico de los retinoides dan lugar a estructuras modificadas, algunas de las cuales poseen una estabilidad química considerable, como es el caso de algunos aductos oxigenados preparados de forma selectiva [1976 JOCU 2532].

El oxígeno singulete, que se produce fotoquímicamente utilizando una porfirina como modificador, es el responsable de una reacción de adición con el acetato de retinilo, para dar un producto principal y tres subproductos [1970 BSCF 1968].

II.A.5.3 DIMERIZACIONES OXIDATIVAS Y ELECTORREDUCCIONES

Se ha comprobado que es posible modificar retinoides mediante reducciones electrolíticas. El acetato de retinilo se reduce a axerofteno con un buen rendimiento, a un potencial de -2'0 V en dimetilformamida, usando yoduro de tetraetilamonio como electrolito soporte [1976 JCSCC 779].

La electrodimerización reductiva del retinal en presencia de ésteres, como el malonato de dietilo, da C₄₀ pinacol, producto de interés como intermediario en la síntesis de β-caroteno [1979 JACS 4412].

II.A.5.4 FOTOQUÍMICA DE LOS RETINOIDES

La fotoisomerización del retinal es uno de los pasos fundamentales en el proceso de la visión. Desde hace tiempo se sabe que el 11-*cis* retinal y/o sus 3,4-didehidroderivados son cromóforos que se encuentran presentes en todas las especies animales [1968 S 230]. Mediante su unión a distintas lipoproteínas, estos aldehídos forman sistemas capaces de absorber la luz, y todos los pigmentos visuales estudiados contienen una molécula de retinal por molécula de opsina [1954 JGP 381]. Entre todos los

retinoides, los retinales sufren la isomerización fotoquímica con una especial facilidad [1971 L IIIb].

Se ha llevado a cabo un gran número de investigaciones sobre la fotoisomerización de los retinales y sus bases de Schiff, incluyendo el estudio de sus eficacias cuánticas bajo excitación directa y sensibilización vía triplete [1970 PP 249] [1976 JACS 4189].

Cuando se irradia el todo-*trans* retinal en un disolvente no polar con radiaciones de longitud de onda superior a 350 nm, el producto mayoritario obtenido es el 13-*cis* retinal, siendo el siguiente producto en importancia que se forma el isómero 9-*cis*. La irradiación en un disolvente polar como el etanol o el acetonitrilo, da como productos los isómeros 11-*cis*, 9-*cis* y 13-*cis*, junto con una pequeña cantidad de 7-*cis* retinal (TABLA I). La fotólisis directa del todo-*trans* retinal como método de isomerización preparativa se ha utilizado con éxito en la síntesis del 11-*cis* retinal empleando como disolvente etanol [1979 BCSJ 265] o acetonitrilo [1981 PP 267], obteniéndose asimismo pequeñas cantidades de los isómeros 9,11-*dicis*, 9,13-*dicis*, 7,13-*dicis* y 7,9-*dicis*. En la fotooxidación sensibilizada, el retinal da el compuesto X vía peróxido cíclico, el cual en contacto con el oxígeno atmosférico se fragmenta muy rápidamente para dar la lactona Y [1966 BSCF 2144] [1970 BSCF 1968] (FIGURA 10).

Cuando se expone a la luz ultravioleta el acetato de retinilo disuelto en hexano se produce una dimerización con formación del aducto [1968 BSCF 4639] [1968 CJC 3025].

Disolvente	Porcentaje de isómero				
	todo- <i>trans</i>	7- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>
<i>n</i> -Hexano	54'0	0'0	5'0	0'0	41'0
Etanol	61'0	0'5	3'0	18'0	18'0
Acetonitrilo	21'0	3'0	12'5	44'0	19'5

TABLA I: Porcentaje de distribución de los isómeros del retinal en el fotoequilibrio (equilibrio fotoestacionario) [1980 JNSV 319].

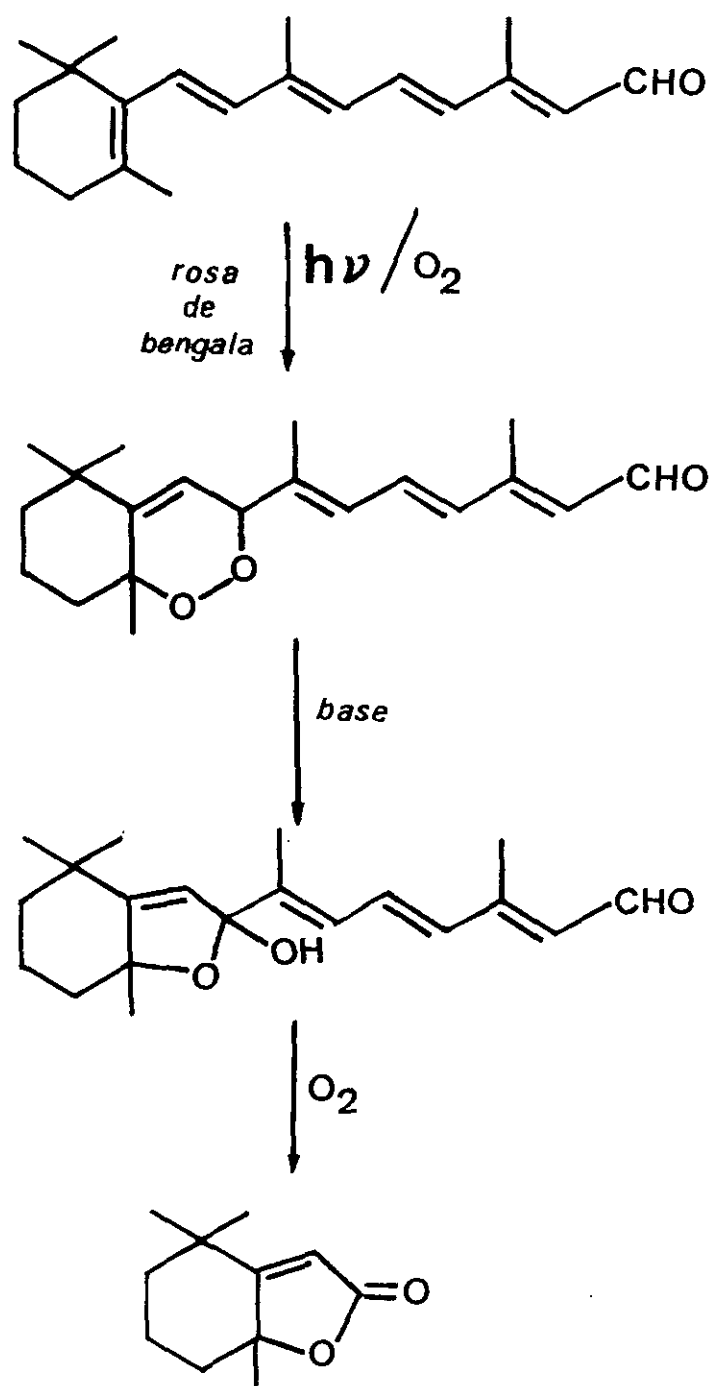


FIGURA 10: Fotooxidación sensibilizada del todo-trans retinal via peróxido ciclico,

II.A.6 METODOS DE ANALISIS DE RETINOIDES

II.A.6.1 METODOS QUIMICOS E INSTRUMENTALES

Cuando el retinol o su ésteres se mezclan con un ácido de Lewis en condiciones anhidras, se produce un intenso color azul inestable. Utilizando cloruro de antimonio como ácido de Lewis y cloroformo anhidro como disolvente, Carr y Price [1926 JB 497] desarrollaron un método para la **determinación colorimétrica** del retinol. A partir de entonces se propusieron una serie de métodos, utilizando distintos ácidos de Lewis, incluyendo el ácido trifluoroacético y el ácido tricloroacético. También se estudió la estabilidad del complejo coloreado que se formaba en varios disolventes [1976 JAOAC 1125]. La intensidad máxima del color azul inicial del complejo formado es aproximadamente tres veces mayor que la absorbancia ultravioleta del retinol.

En estos métodos basados en el uso de un ácido de Lewis, tanto el retinol como sus ésteres dan la misma intensidad de color y todos los isómeros de un mismo compuesto reaccionan de forma idéntica. Con el retinol se pueden obtener dos tipos de complejos de diferente color, uno de color azul intenso inestable $\lambda_{max} = 620$ nm, que se forma y desaparece rápidamente y un complejo mucho más estable, violeta o rosa, cuyo máximo de absorción aparece entre 1 y 10 minutos después de la adición de los reactivos y es estable durante medio minuto o más. El máximo de absorción de este complejo de retinol se encuentra situado entre 502 y 555 nm, dependiendo de los reactivos utilizados y de las condiciones del experimento. Los complejos inestables coloreados que se forman con el retinol y el ácido retinoico son probablemente especies cargadas tal y como ocurre en el caso del retinol.

Esta técnica tiene la ventaja de ser rápida y barata, posee una sensibilidad adecuada (10-20 ng) y es selectiva en la mayoría de las aplicaciones. Existen varias desventajas; en primer lugar no siempre es fácil la medida exacta del complejo inestable de color azul, por lo que hay que definir las condiciones de medida de forma muy rigurosa. En segundo lugar, los ácidos de Lewis se utilizan en concentraciones relativamente elevadas, lo cual es corrosivo para los aparatos y peligroso para el hombre. En tercer lugar, el método no es específico, ya que la mayor parte de los polienos, incluyendo los carotenoides, reaccionan con estos reactivos para dar complejos coloreados.

Ya que el retinol todo-*trans* absorbe intensamente a 325 nm ($\epsilon = 52.995$ en etanol), la **espectroscopia de absorción ultravioleta-visible** es una técnica analítica adecuada para la determinación de retinoides. La medida directa de la absorbancia ultravioleta es importante para determinar la concentración de estos compuestos en los estándares de referencia y en las preparaciones farmacéuticas. Además, la absorción en el ultravioleta es el principal método de detección usado en HPLC para el análisis de retinoides.

El método de la inactivación a la luz ultravioleta, para la medida del retinol [1946 JBC 177], se basa tanto en la alta absorbancia del retinol y sus ésteres a 325 nm, como en su facilidad para fotooxidarse y polimerizarse a productos no absorbentes. Por lo tanto lo que se lleva a cabo es una medida de la absorbancia a 328 nm antes y después de la exposición de la muestra a la luz ultravioleta, aunque para que este método funcione de forma correcta deben tomarse numerosas precauciones. Aunque en un principio, el método se utilizó para el análisis de retinol y sus ésteres en sangre y tejidos, también pueden analizarse retinal (que se inactiva a una velocidad similar a la del retinol) y el ácido retinoico, que se destruye de 3 a 8 veces más lentamente [1967 CC 1039].

Desde los años 20 se sabe que tanto el retinol como sus ésteres emiten una **fluorescencia** verde claro cuando se excitan con luz ultravioleta. Sobotka y col. [1943 JACS 1959] [1944 JBC 635] propusieron un análisis fluorescente semicuantitativo, indicando que la pérdida rápida de la fluorescencia era al menos en parte debida a la fotooxidación. Fujita y Aoyama [1951 JB 271] analizaron el retinol por fluorimetría en aceites de hígado de pescado, y en 1955 De [1955 IJMR 391] desarrolló un método similar para analizar fluorimétricamente el retinol en suero.

En condiciones normales, el retinol y sus ésteres son los únicos retinoides naturales que poseen una fluorescencia apreciable. No ocurre lo mismo con el anhidrorretinol, el ácido retinoico ni el retinal, aunque son capaces de emitir fluorescencia a bajas temperaturas o en condiciones especiales.

Hasta casi principios de los años 70 no se llevaron a cabo ensayos más rigurosos para el análisis de la vitamina A en plasma [1973 IJVNR 127] [1978 JAOAC 1370] [1981 JAOAC 225]. Las características de los métodos más importantes empleados se muestran en la TABLA II. El retinol fluoresce en la misma proporción ya sea en forma libre o

Compuesto	Disolvente	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Tejidos
ROL,RE	Ciclohexano	345	490	Suero o plasma
ROL,RE	Ciclohexano Hexano	340	> 485	Suero, Hígado
ROL,RE	<i>n</i> -Butanol	340	490	Suero, Hígado, Retina
ROL	Xileno	350	490	Suero
ROL,RE	Hexano	330, 365	480	Suero, Hígado, Productos lácteos
ROL	Cimeno	360	490	Suero
ROL	Hexano	330, 360	480	Alimentos
ROL	Hexano/ propanol	330, 360	480	Suero
ROL	Suero diluido	335	458	Suero
ROL	Ciclohexano	327	480	Suero
ROL,RE	Hexano/éter	330	480	Suero

TABLA II : *Métodos fluorimétricos utilizados para el análisis de retinoides, ROL: retinol, RE: éster de retinilo.*

esterificado. Sin embargo, cuando el retinol se une a proteínas específicas del plasma como la RBP (retinol-binding protein), la fluorescencia se incrementa de forma considerable [1972 BBA 670]. Por ello, este aumento de la fluorescencia se ha utilizado para el desarrollo de un método muy sensible para la determinación de retinol [1975 IO 125].

El disolvente que se emplea en las medidas de fluorescencia es de gran importancia. Generalmente se utilizan disolventes tales como hexano, dioxano, ciclohexano, xileno o algún otro disolvente hidrocarbonado no polar, ya que los disolventes polares tales como etanol, cloroformo o acetona, tienden a amortiguar la fluorescencia [1967 PPFASEB 636]. Tanto la longitud de onda de excitación como la de emisión dependen asimismo del disolvente utilizado. Generalmente el máximo de excitación no corregido se encuentra situado entre 325 y 335 nm y el máximo de emisión no corregido se sitúa entre 470 y 490 nm [1967 PPFASEB 636]. En los espectros de fluorescencia corregidos el máximo de excitación se desplaza sólo de 2 a 3 nm hacia el rojo mientras que el máximo de emisión lo hace unos 40 nm [1959 DFS 180].

La sensibilidad de la espectroscopia de fluorescencia para el análisis de retinol y sus ésteres es comparable a la que muestran otros métodos. Los ensayos de fiabilidad se ven afectados por muchos factores. Uno de ellos puede ser la fluorescencia nativa de algunos compuestos de los tejidos que se extraen. En el caso del plasma un ejemplo sería el pigmento fitoflueno, con un máximo de emisión similar al del retinol y que presenta una intensidad de fluorescencia unas 6 veces mayor. Como las muestras se irradian con un haz de excitación muy intenso, se pueden formar polímeros que sean más fluorescentes que el propio retinol [1971 BM 67]. También puede ocurrir que el retinol se destruya muy rápidamente. Debe emplearse por tanto una rendija de excitación estrecha y se debe valorar la estabilidad de las soluciones de retinol y de acetato de retinilo durante las medidas de fluorescencia.

La **espectrometría de masas** puede ser una técnica muy sensible para determinar retinol y sus derivados en plasma y tejidos. También se ha analizado ácido retinoico en plasma mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) [1975 CC 1031] [1979 AB 402] [1980 JC 335]. Esta técnica es asimismo de gran utilidad para caracterizar otros metabolitos altamente purificados de los retinoides. Se deben destacar

en este apartado dos estudios muy rigurosos [1967 HCA 1243] [1970 AB 435] y una excelente revisión [1972 L V].

El acetato de retinilo presenta el mismo tipo de fragmentación que el retinol, excepto en el hecho de que en vez de agua se separa una molécula de acético. En condiciones normales el retinal, el ácido retinoico y el anhidrorretinol son mucho más estables. En todos los casos, el ion molecular es también el ion base y se produce una menor fragmentación. En estos casos, la desmetilación que se produce en el carbono C₅ del anillo de ciclohexeno es la que da un pico mayor. A pesar de ser menos sensible que el de ionización por impacto electrónico, se puede utilizar el método de ionización química de forma alternativa. En el caso del anhidrorretinol y del retinal se obtienen excelentes rendimientos de iones M⁺ [1981 FPFASEB 859]. La espectrometría de masas es también una técnica útil en la identificación de metabolitos desconocidos de retinoides, utilizándose previamente el HPLC para su separación. En la mayor parte de los casos las muestras se metilan para incrementar su volatilidad.

Los **métodos electroquímicos** han demostrado también ser de utilidad en el análisis de soluciones concentradas, aceites y preparaciones farmacéuticas [1975 A 827] [1976 FEP 244], habiéndose estudiado el mecanismo de reacción reductiva para el retinol, el retinal y la retiniliden-*n*-butilamina [1978 JES 216] [1980 JEC 377] [1981 JES 1248]. A pesar de que las reacciones son complejas, el primer paso parece ser la adición de un electrón para producir un anión radicalario ($\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$ para el retinal) que puede protonarse y nuevamente reducido, puede aceptar un electrón y formar un dianión o bien interaccionar con otro anión radicalario.

En la TABLA III se muestra un resumen de los métodos analíticos utilizados en la determinación cuantitativa de retinoides. Parece claro que el HPLC es el procedimiento más sensible y en el que se producen menos artefactos, y además es aplicable a una amplia gama de retinoides, tanto naturales como de síntesis. Cuando se trata únicamente de niveles totales de retinol, la fluorescencia es una técnica igualmente sensible aunque existe la posibilidad de interferencias debido a otros contaminantes presentes en la muestra. La fiabilidad de los análisis por fluorescencia puede mejorarse mediante la separación cromatográfica del retinol y sus contaminantes, aunque este procedimiento es largo y

Método	Sensibilidad	Ventajas	Desventajas
HPLC	2-5 ng	1. Selectivo, permite la cuantificación de los retinoides y sus isómeros 2. Puede usarse para todos los retinoides que absorban en el UV 3. No hay interferencias 4. Puede automatizarse	1. Coste inicial del equipo elevado 2. Tiempo de análisis de cada muestra entre 8-10 minutos
Fluorescencia	1-5 ng	1. Se puede analizar un número elevado de muestras de forma rápida y barata 2. Se puede automatizar	1. Coste inicial del equipo elevado 2. Solamente aplicable al retinol y los ésteres 3. Puede haber interferencias debido a contaminantes fluorescentes
Inactivación UV	3-5 ng	1. Fácil de llevar a cabo	1. Requiere dos medidas para cada muestra 2. Puede haber interferencias por otros contaminantes 3. Las condiciones de la irradiación son críticas
Colorimetría	10-20 ng	1. Rápida y barata	1. El color del complejo es transitorio 2. Volatilidad de los disolventes utilizados 3. Uso de ácidos corrosivos 4. Reacción con todos los polienos

TABLA III: Resumen de los métodos usados habitualmente en el análisis de retinoides.

tedioso. El procedimiento colorimétrico aunque menos sensible, tiene la ventaja de que puede llevarse a cabo más fácilmente in situ.

Entre las **técnicas analíticas de separación** de retinoides se han utilizado casi todos los tipos de cromatografía en columna convencional, usando como soportes la alúmina, la sílice, el Sephadex LH-20 y la cromatografía en capa delgada, detectándose los retinoides mediante absorción ultravioleta a 310-350 nm. En la cromatografía con alúmina se utiliza normalmente alúmina desactivada con un 5% de agua y éter etílico, benceno o acetona en hexano como eluyente. Este tipo de cromatografía de adsorción se ha utilizado frecuentemente para separar el retinol de sus ésteres [1971 BM 67] [1974 IJVR 375] y se ha señalado que es capaz de conseguir la separación entre el todo-*trans* retinal y el ácido retinoico y del 13-*cis* retinal.

La sílice es activada mediante calor; con estas columnas convencionales se pueden separar el retinol, el retinal, así como el ácido retinoico y sus metabolitos más polares, con porcentajes de recuperación comprendidos entre un 60 y un 100%. Por el contrario, los ésteres de retinilo muestran un porcentaje de recuperación bastante más bajo (entre un 10 y un 15%) generándose distintos productos de oxidación [1973 CC 977]. El uso de ácido silícico tratado con álcalis incrementa la recuperación de los ésteres hasta un 80 a un 95% aunque se produce una degradación del retinol. Se ha señalado una isomerización de hasta un 30% de algunos de los retinoides [1967 BBA 639] [1968 AB 307] por lo que este tipo de cromatografía no se recomienda para la separación de retinoides.

El uso de Sephadex LH-20 proporciona un porcentaje de recuperación de ésteres de retinilo, retinal, retinol y ácido retinoico sin apenas degradación, que varía entre un 96 y un 99% [1974 JLR 517]. La mayor desventaja de esta técnica es la imposibilidad de separar los distintos ésteres ni entre sí ni del retinal [1974 JLR 517] [1976 JC 225], lo que la limita a compuestos más polares que el retinol.

La cromatografía en capa delgada se utiliza casi exclusivamente con silicagel G como fase estacionaria; como fase móvil se utiliza un alcano como el hexano, el éter de petróleo o el benceno como componente mayoritario y una pequeña cantidad de un disolvente más polar como el éter etílico, acetona, cloroformo o acetato de etilo. Tras el desarrollo, los retinoides pueden detectarse con métodos clásicos de revelado de lípidos,

como el uso de vapor de yodo o un ácido fuerte. Existen métodos más específicos, como la detección fluorescente con luz ultravioleta a 300-370 nm o vaporizando con una solución de tricloruro de antimonio en cloroformo. Esta técnica sirve, entre otras aplicaciones, para separar ésteres de retinilo, retinol, retinal y ácido retinoico [1969 CC 479] así como isómeros de retinal y de retinol [1973 JBC 7773]. Entre las ventajas que presenta, citaremos su rapidez y que las cantidades de muestra que se necesitan son pequeñas.

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase normal se utiliza para separar retinoides que no sean demasiado polares (ésteres de retinilo, retinol, retinal y análogos), usando solventes isocráticos y columnas con micropartículas de gel de sílice. Con este tipo de cromatografía se pueden separar fácilmente retinoides que difieren únicamente por su configuración isomérica. Casi siempre se utiliza como fase móvil hexano, con una pequeña cantidad de un solvente orgánico más polar. Aunque la fase normal se ha utilizado principalmente para separar los retinoides apolares, existen numerosas referencias bibliográficas sobre la separación cromatográfica en columna de silicagel de los isómeros geométricos del ácido retinoico y sus metabolitos [1977 HCA 881] [1978 AB 25] [1978 JC 421] [1980 JBC 8057]. Se puede reducir la polaridad de estos retinoides mediante esterificación previa, ya que de otro modo estos compuestos polares se adsorben con fuerza a la sílice, haciendo necesario el uso de un eluyente muy polar.

Por último, cuando se manejan mezclas que contienen retinoides de polaridad diferente, generalmente se utiliza un gradiente de solventes para conseguir una separación adecuada de las moléculas más apolares y además poder eluir los compuestos más polares [1980 VR 355] [1982 AB 428]. Esto puede crear a veces problemas ya que los tiempos de retención no son reproducibles.

Desde un punto de vista operativo, el HPLC en fase inversa difiere del HPLC en fase normal en dos aspectos importantes. En primer lugar, este tipo de sistema cromatográfico no es sensible a la presencia de agua, ni en la muestra ni en los disolventes, pudiéndose utilizar gradientes de solventes que cubran un amplio intervalo de polaridades sin temor a que se desplace el agua de la columna y se creen, de este modo, tiempos de retención no reproducibles. En segundo lugar, en cromatografía en fase inversa, los compuestos más

polares son los que eluyen primero, mientras que en fase normal un metabolito muy polar se uniría con mucha fuerza al soporte, requiriendo quizás un cambio muy drástico de solvente para conseguir la elución.

Esto resulta especialmente útil cuando se quieren separar los metabolitos del ácido retinoico, generalmente más polares que éste. Sin embargo la fase normal suele ser más adecuada que la fase inversa para conseguir la resolución de retinoides muy parecidos [1980 L VI] como pueden ser los isómeros del retinol y del retinal [1982 JC 244]. A pesar de que la fase inversa se usa sobre todo para la separación de retinoides más polares, ha permitido una excelente separación de una mezcla de ésteres de retinilo [1981 AB 324]. Finalmente señalaremos que la fase inversa da muy buenos resultados cuando se quieren separar mezclas de retinoides que abarcan un amplio intervalo de polaridades.

Las ventajas que presenta el HPLC sobre otro tipo de técnicas de separación son numerosas. En primer lugar, es una técnica extremadamente rápida, consiguiéndose separaciones que en la mayoría de los casos duran sólo unos minutos. En segundo lugar proporciona una gran resolución en la separación de compuestos estrechamente relacionados. Varios autores han confirmado que el HPLC proporciona mejores separaciones de isómeros de los distintos retinoides que la cromatografía en capa delgada [1977 JC 331] [1979 JC 125]. También se consigue resolver, en un único sistema cromatográfico, retinoides cuya polaridad es muy diferente. En tercer lugar, se consiguen rendimientos de recuperación muy elevados ($> 95\%$). En cuarto lugar es una técnica muy sensible, capaz de detectar niveles de retinoides del orden del nanogramo. Finalmente, el HPLC es una técnica cromatográfica no destructiva produciéndose pocos o ningún isómero u otros productos de oxidación durante su desarrollo.

Como cualquier otra técnica analítica, presenta sin embargo problemas, siendo el más importante una disminución gradual de la eficacia de la columna debido por ejemplo, en el caso de muestras biológicas, a la adsorción de fosfolípidos al empaquetado de la columna.

Ya que los retinoides tienen una elevada absorción en el ultravioleta, este tipo de sistema de detección se utiliza con frecuencia. Se pueden detectar de este modo hasta 2 ng de ácido retinoico. Un segundo método de detección es la fluorimetría. Como ya

hemos señalado, utilizando las propiedades fluorescentes del retinol y sus ésteres, éstos pueden detectarse fácilmente a 470 nm, si se excitan a 325 nm, aunque no puede decirse lo mismo en el caso del retinal y el ácido retinoico. Por este método, pueden detectarse del orden de 5-10 ng de retinol. Finalmente los retinoides marcados con isótopos radiactivos pueden detectarse mediante contadores de centelleo.

En cuanto a las aplicaciones del HPLC en la investigación, se puede decir que esta técnica ha supuesto un método rápido y fiable para la determinación de la pureza de los retinoides como paso previo a su utilización experimental [1978 JLR 32] [1980 L VI] y para el aislamiento de los metabolitos de estos compuestos, con un buen porcentaje de recuperación y sin que se produzcan compuestos de degradación [1979 ABB 577]. El HPLC es asimismo una técnica analítica extremadamente sensible para la detección de retinoides, naturales o de síntesis, en muestras de tipo biológico. El análisis de retinol por HPLC es un método que posee una sensibilidad comparable a la fluorimetría (ambas técnicas son capaces de detectar 10 ng de retinol) pero es una técnica más específica ya que es capaz de distinguir entre distintos isómeros del retinol. Es por esto que la cromatografía líquida de alta eficacia se ha convertido en la técnica de elección para la determinación de vitamina A y de ácido retinoico y sus metabolitos en muestras biológicas.

La cromatografía de gases tiene un uso limitado en el análisis de los retinoides, debido a la inestabilidad que presentan estos compuestos frente al calor. Tanto el retinol, como el acetato y el palmitato de retinilo se deshidratan para dar anhidrovitamina A a temperaturas de tan sólo 150°C [1963 Bit 349]. Se ha visto, que a pesar de que el anhidrorretinol muestra una estabilidad mucho mayor cuando se analiza por cromatografía de gases en algunos casos se isomeriza ampliamente dando una mezcla de isómeros *cis-trans* [1981 FPFASEB 859].

Se han descrito dos métodos para estabilizar el retinol durante su determinación por cromatografía en fase gaseosa. Uno de ellos es la formación de éteres trimetilsililados [1973 JC 447] [1967 HCA 1243] y otro es la formación de perhidroderivados mediante hidrogenación catalítica [1973 JC 410]. Otros retinoides tales como el metil retinil éter, el retinal y el retinoato de metilo, presentan una mayor estabilidad, obteniéndose separaciones con un buen porcentaje de recuperación (desde un 78 hasta un 100%) y con un grado de isomerización limitado [1980 JC 335].

A pesar de que las modernas técnicas de análisis químico e instrumental han remplazado a muchos de los ensayos biológicos clásicos para la determinación de la vitamina A, la utilización de **métodos biológicos** para medir respuestas celulares altamente específicas, sigue siendo un hecho importante en el desarrollo de nuevos retinoides y en el estudio de su mecanismo de acción. Los ensayos biológicos con retinoides son, por lo tanto, un complemento de los métodos químicos en el sentido de que los ensayos biológicos proporcionan una medida de la función, mientras que los ensayos químicos pueden suministrar una medida más exacta de las cantidades específicas de retinoides presentes en la muestra que se va a analizar.

Debido a su capacidad para suministrar información acerca de la función de los retinoides, los métodos de cultivo celular se seguirán utilizando en el futuro a pesar de los avances que se puedan producir en el campo de la química analítica. Los ensayos biológicos son de una especial importancia en dos áreas de la investigación de los retinoides:

- En la búsqueda de nuevos retinoides que puedan ser útiles en la prevención o el tratamiento de numerosas enfermedades. En particular los bioensayos pueden dar información rápida al químico orgánico sobre como pueden tener una actividad funcional completamente diferente, dos retinoides que difieran únicamente en la configuración *cis-trans* alrededor de un único doble enlace o en la localización de un grupo carboxílico (*orto*, *meta* o *para*) en un anillo bencénico,
- En el terreno de la moderna genética molecular para comenzar a explorar el problema aún sin resolver, del mecanismo de acción celular de los retinoides.

Los ensayos biológicos de los retinoides se pueden dividir básicamente en dos tipos: ensayos *in vivo* y ensayos *in vitro*. Existen cinco tipos de ensayos "in vivo": promoción del crecimiento, acumulación en el hígado, frotis vaginal, ensayo de efectos sobre el papiloma de ratón y supresión de la diferenciación sebácea en el hamster. Entre los ensayos "in vitro" cabe distinguir: si se utilizan cultivos de órganos, si se utilizan cultivos celulares o

si se utilizan sistemas sin células. Dentro de los dos primeros tipos existen a su vez distintos tipos [1984 L VII].

II.B INTERACCIONES ENTRE MOLECULAS EN MEDIOS FLUIDOS

II.B.1 EL ENTORNO MOLECULAR. INTERACCIONES SOLUTO-SOLVENTE

Es conocido que el solvente puede alterar la cinética o el mecanismo de una *reacción química* [1990 L VIII]. Igualmente, puede modificar las características espectroscópicas, produciéndose desplazamientos en las longitudes de onda y variando la intensidad de las bandas de absorción y emisión [1990 L IX]. Tales modificaciones son consecuencia de los distintos tipos de interacción que se producen entre las moléculas de solvente y soluto, las cuales se pueden agrupar en dos grandes apartados:

- A) Interacciones por fuerzas intermoleculares.
- B) Interacciones químicas.

Ambos tipos de interacción tienen en común la inexistencia de uniones covalentes entre el soluto y el solvente.

A) INTERACCIONES POR FUERZAS INTERMOLECULARES

Las fuerzas intermoleculares no covalentes son consecuencia de la interacción no covalente entre moléculas de: solvente-solvente, solvente-soluto y soluto-soluto, originando tres tipos de fuerzas atractivas:

- Fuerzas electrostáticas.
- Fuerzas de inducción.
- Fuerzas de dispersión.

Las fuerzas de atracción electrostáticas son debidas a las interacciones entre las cargas de los iones o los momentos dipolares o cuadripolares en el caso las moléculas polares.

Las fuerzas de inducción surgen del efecto que el momento dipolar de una molécula induce en la molécula adyacente, originando así la separación de cargas en esta última. Se denominan fuerzas de polarización porque vienen definidas por el parámetro α , conocido

como polarizabilidad. Algunos autores utilizan la denominación de "interacciones dipolo - dipolo inducido".

Las fuerzas de dispersión también llamadas de London o interacciones dipolo inducido-dipolo inducido, se explican teniendo en cuenta que en un instante cualquiera, la distribución electrónica de una molécula puede ser consecuencia de la creación de un momento dipolar instantáneo en esa molécula, aún tratándose de una molécula esférica no polar. Este momento dipolar instantáneo es capaz de inducir un momento dipolar en las moléculas adyacentes, produciéndose así una interacción entre los momentos dipolares de ambas.

Debido a que las distancias entre partículas son variables, según sea este valor predominarán uno u otro tipo de fuerzas. Algunos autores prefieren la denominación conjunta de **Fuerzas de Van der Waals** para referirse a este conjunto de fuerzas de atracción que implican una interacción que podríamos calificar como de "tipo físico".

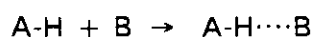
B) INTERACCIONES QUÍMICAS

Este tipo de interacciones puede establecerse entre las parejas solvente-solvente, solvente-soluto y soluto-soluto, pudiéndose clasificar en tres grandes apartados:

- Interacciones por transferencia de carga.
- Enlaces por puentes de hidrógeno.
- Interacciones hidrofóbicas.

El concepto de interacción por transferencia de carga fue introducido por Mullikan [1952 JACS 811] [1969 L X] para explicar la formación de un complejo molecular, el cual da lugar a una banda en el espectro de absorción que no es atribuible a las especies moleculares aisladas sino al complejo formado por ambas. El sistema yodo (soluto)/ benceno (solvente) estudiado por Benesi y Hildebrand [1949 JACS 2703], se ajusta perfectamente a este comportamiento. La especie originada se denomina "complejo de transferencia de carga" y para que esto ocurra es necesario que una especie actúe como donador y otra como aceptor de electrones.

En los enlaces por puentes de hidrógeno, para que se produzca tal interacción se requiere el que una especie actúe como donador de protones (ácido) y otra como aceptor de protones (base), lo que puede representarse del siguiente modo:



Se produce por tanto una transferencia parcial del protón de A a B, o lo que es lo mismo, una transferencia parcial de un par de electrones de B a A. Por tanto podría considerarse como un caso especial de un complejo de transferencia de carga, aunque en el caso de los puentes de hidrógeno, la fuerza del enlace está regida por una interacción de tipo electrostático (dipolo-dipolo).

Las interacciones hidrofóbicas son aquellas que regulan el comportamiento de los solutos no polares en agua. Se produce este tipo de interacciones, primero en el caso de los solutos de un marcado carácter apolar, como es el caso de los hidrocarburos aromáticos, que son prácticamente insolubles en agua; y segundo, si estos solutos no polares tienden a formar agregados moleculares en soluciones acuosas. Algunos autores denominan al primer caso como "efecto hidrofóbico" y al segundo "interacción hidrofóbica".

Existen varias teorías para explicar el comportamiento de los solutos apolares en el seno de soluciones acuosas. Una de ellas se basa en la propia estructura del agua. Según Frank y Evans [1945 JPC 507], los solutos no polares inducen en el agua una estructura local muy ordenada de las moléculas del solvente (FIGURA 11), lo cual hace que el proceso de disolución sea entrópicamente desfavorable. Apoyándose en esta teoría, Kauzmann [1954 APC 1] postula que una interacción hidrofóbica entre los solutos, tendrá como consecuencia una relajación en el entorno (solvente) de las moléculas de agua, produciéndose un cambio favorable en la entropía, a medida que los solutos se asocian. La interpretación estructural de los fenómenos de interacción hidrofóbica ha sido revisada en diversas ocasiones [1963 ARB 269] [1980 L XI] [1985 L XII], concluyéndose que para que se produzca tal fenómeno, el cambio de la entropía ha de ser favorable.

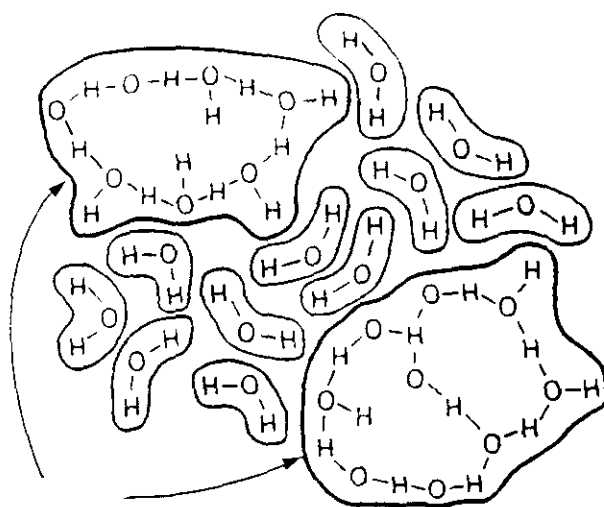


FIGURA 11: Organización de las moléculas de agua en el seno de solventes hidrófobos.

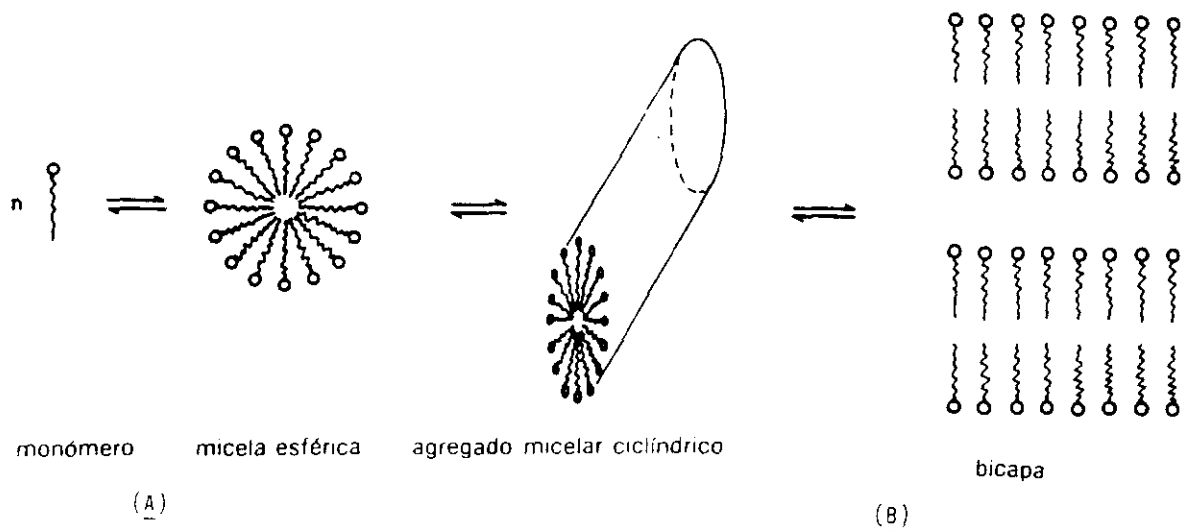


FIGURA 12: Fenómenos de agregación micelar: (A) Formación de micelas esféricas a partir de monómeros de tensoactivo, (B) agregación del tensoactivo para originar micelas de aspecto cilíndrico y bicapas.

Otra teoría para explicar el efecto hidrofóbico es la denominada "teoría de la cavidad". La aplicación de esta teoría a los fenómenos de interacción hidrofóbica se debe a Sinanoghi [1968 L XIII] [1985 BC 157]. Así, para que un determinado soluto pueda disolverse en un medio, es necesaria la formación de una cavidad en el solvente. Esta cavidad se forma a expensas de una energía:

$$E = A\gamma$$

siendo A el área de la cavidad y γ la tensión superficial del solvente. Cuanto mayor sea esta tensión, mayor es el trabajo necesario para crear la cavidad. Desde este punto de vista las interacciones hidrofóbicas son consecuencia de la elevada tensión superficial del agua, lo cual está en estrecha relación con su estructura. La teoría de la cavidad ha sido ampliamente criticada [1970 JACS 6419], siendo la principal objeción el hecho de extrapolar a escala molecular, conceptos de orden macroscópico como puede ser la tensión superficial. Una demostración de la validez de la teoría de la cavidad fue puesta de manifiesto mediante el empleo de lechos de vidrio silanizado, los cuales se agregan en solventes polares y se dispersan en solventes no polares [1967 N 369].

Jencks [1969 L XIV] ha propuesto un modelo de interacción hidrofóbica que engloba la teoría de la cavidad y la de la estructura del solvente. Así pues, la estructura del solvente se verá modificada por la entrada de una molécula de soluto en el interior de la cavidad, cuyas características vendrán determinadas por la polaridad del soluto. Como consecuencia, se genera una fuerza conductora que dirige la asociación y que implica ya sea un cambio favorable en la entalpía o en la entropía. En esta misma línea Ben-Naim [1974 L XV] concluye que para una interacción hidrofóbica, ΔG° dependerá no sólo de la estructura del agua sino de los cambios estructurales que se produzcan como consecuencia de la interacción hidrofóbica.

Tanto los agregados micelares, que poseen actividad superficial, como las ciclodextrinas, tienen la característica común de establecer interacciones hidrofóbicas con solutos apolares en el seno de un solvente polar como es el agua. Por tanto son capaces de solubilizar numerosos compuestos de carácter hidrofóbico gracias a la formación de compuestos de inclusión en el caso de las ciclodextrinas, o bien debido a fenómenos de asociación entre el soluto y el agregado micelar. De esta forma, además de una

solubilización se consigue el aislamiento de la molécula de carácter hidrófobo en el seno de una solución acuosa.

Las moléculas se asocian a las micelas y a las ciclodextrinas constituyendo un aducto, formando una entidad aislada y compartimentalizada en solución, que presenta características químicas y espectroscópicas semejantes a las que exhibiría el soluto en un solvente de polaridad inferior al agua. Como ejemplo que pone de manifiesto esta propiedad tenemos el de un conocido marcador fluorescente, el ácido 1-anilino naftaleno-8-sulfónico (ANS), que fluoresce intensamente en solventes orgánicos, pero que muestra una debilísima fluorescencia en agua. Asmus [1976 JC 317] observó que las soluciones acuosas que contenían este marcador incrementaban notablemente su fluorescencia debido a la presencia de trazas de lípidos, lo cual se utiliza como recurso para la detección de lípidos por HPLC ya que se pone de manifiesto una interacción entre el marcador y los lípidos, ambos débilmente solubles en agua. Igualmente, las soluciones acuosas de ANS ven incrementada su fluorescencia por la adición de tensoactivos, tanto de carácter iónico como no iónico, gracias a la asociación del citado marcador en el medio micelar [1969 B 2742] [1972 JACS 5089] [1973 JACS 5508] [1975 CPL 329]. Cramer [1967 JACS 14] observó que las soluciones acuosas de ANS se vuelven significativamente más fluorescentes tras la adición de α -CD (la señal se duplica) y β -CD (la señal de fluorescencia se hace diez veces mayor). Este hecho se explica teniendo en cuenta la formación de un complejo de inclusión con las mencionadas ciclodextrinas, merced a la capacidad del marcador de penetrar en la cavidad hidrofóbica de las mismas.

Entre las características comunes de los medios micelares y de los complejos de inclusión con ciclodextrinas se encuentran principalmente su capacidad de solubilización y organización del microentorno, la naturaleza de las interacciones implicadas en los aductos, así como en la reactividad y modificación de las características espectroscópicas y cromatográficas de los solutos. Sin embargo existen diferencias significativas entre ambas entidades químicas, por lo que nos detendremos a considerar pormenorizadamente las características de cada una de ellas.

Dado que la parte experimental de esta memoria profundiza en el estudio de los complejos de inclusión con ciclodextrinas en medios líquidos, consideraremos de forma más somera los complejos de inclusión sólidos, si bien en este caso no es correcto hablar

de ellos como medios microscópicamente organizados, ya que esta denominación hace siempre referencia a los medios fluidos. En los últimos años, las soluciones acuosas de micelas y ciclodextrinas se han denominado medios microscópicamente organizados ya que son sistemas que poseen especies químicas en disolución y son capaces de "organizar" o "compartimentalizar" el entorno molecular del compuesto que se estudia. El medio, generalmente entendido como el solvente en el que se encuentran disueltas las moléculas de interés, ejerce una influencia crítica tanto sobre las características químicas y espectroscópicas como sobre la reactividad química de los compuestos problema.

II.B.2 MEDIOS MICELARES

II.B.2.1 INTRODUCCION

Las micelas son agregados de dimensiones coloidales constituidos por unidades monoméricas, las cuales poseen características anfifílicas. Así pues, una parte de la molécula presenta carácter hidrofóbico mientras que la otra exhibe propiedades hidrófilas. Estos monómeros se asocian en agua o en solventes orgánicos por encima de un valor de concentración denominado concentración micelar crítica (CMC), para dar lugar a agregados cuyas características difieren de las del monómero y hacen variar al mismo tiempo las propiedades de conjunto de la disolución. Dichos compuestos han sido estudiados en profundidad [1977 L XVI] [1979 L XVII] [1982 L XVIII] [1984 L XIX] [1980 CR 283] y continúan siendo objeto de investigación debido a las interesantes propiedades químicas que presentan y a sus múltiples aplicaciones.

Los agregados micelares son capaces, tanto de "organizarse" en sí mismos, como de "organizar" su entorno, diferenciándose de este modo del sistema líquido en que se encuentran. El grado de organización varía de unos sistemas a otros, siendo los más comunes los que se originan en solventes simples, ya sea agua o disolventes orgánicos.

II.B.2.2 CARACTERISTICAS Y PROPIEDADES

La estructura de la micela es consecuencia de la interacción de varias moléculas de tensoactivo. Estas interacciones son múltiples, predominando las de carácter electrostático e hidrofóbico. Normalmente la parte hidrofóbica de la molécula está constituida por una

cadena hidrocarbonada de ocho eslabones o más, mientras que el resto hidrofílico está formado por un núcleo que puede ser o no portador de carga. En el caso de tratarse de un tensoactivo no iónico, el resto hidrofílico de la molécula lo constituye un agrupamiento polar como es el caso de los agrupamientos oxietilénicos de las series de Triton. Si el resto hidrofílico es portador de carga, ésta puede ser negativa en el caso de los tensoactivos aniónicos, como el dodecilsulfato sódico (SDS) o positiva en el caso de los tensoactivos catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

Por encima de un determinado valor de concentración de tensoactivo se produce la agregación. Esta concentración es característica para cada sistema micelar y se denomina concentración micelar crítica como ya hemos mencionado anteriormente. Una vez que se alcanza este valor de concentración, los monómeros de tensoactivo se unen para formar la micela. Además de la CMC, son propiedades características de cada micela el número de asociación y la disociación iónica. El fenómeno de agregación a partir del monómero se representa en la FIGURA 12.

Si la agregación se produce en solución acuosa, las cadenas hidrofóbicas se orientan hacia el interior (repeliendo al agua), mientras que los residuos hidrofílicos se localizan en la superficie de la esfera que se encuentra en contacto con la fase externa acuosa. De esta manera, tal y como se muestra en la FIGURA 13, la región hidrofóbica que se crea en el interior queda aislada de la fase acuosa externa por una capa que contiene los residuos polares del tensoactivo, reteniéndose al mismo tiempo en esta capa una gran proporción de moléculas de agua que solvatan los restos cargados. Esta capa se denomina "interfase" y en el caso de los tensoactivos iónicos se conoce con el nombre de capa de Stern.

Las propiedades físicas de la interfase (flexibilidad, penetración del agua, fuerza iónica local, pH...) pueden modificarse por la adición de compuestos de naturaleza iónica (sales) o no (urea). Alrededor de la capa de Stern se crea una capa difusa, también llamada doble capa eléctrica de Gouy-Chapman, en la cual se sitúan los contraiones necesarios para neutralizar las cargas eléctricas de la superficie micelar. En esta capa los contraiones se encuentran en equilibrio dinámico con los que se encuentran adsorbidos en la superficie micelar. El espesor de la doble capa eléctrica dependerá de la fuerza iónica del medio, pudiéndose alterar el tamaño y la forma de las micelas al variar la concentración de iones

y aditivos. En el caso de las micelas no iónicas no existen contraiones y las moléculas de agua se enlazan por puentes de hidrógeno a los oxígenos de la cadena polioxietilénica; por tanto las micelas no iónicas están muy hidratadas.

Generalmente las micelas se constituyen en pequeñas esferas de dimensiones comprendidas entre los 10 y los 30 Å de radio [1968 L XX] [1973 L XXI] pero que bajo determinadas circunstancias pueden evolucionar formando agregados de aspecto cilíndrico (rod-like) y de mayor tamaño (FIGURA 12). Las micelas son estructuras dinámicas en las cuales los monómeros están en equilibrio con los agregados, incorporándose y alejándose del agregado micelar [1974 JPC 1024]. El número de agregación, esto es el número de monómeros que se integran para formar la micela, varía dependiendo del tensoactivo y de las condiciones experimentales, pudiendo alcanzar valores de hasta 200 monómeros. En las "micelas normales", el interior (corazón de la micela) es altamente hidrofóbico y la microviscosidad puede alcanzar valores que oscilan entre los 10 y los 30 cP.

Los fenómenos de asociación, además de tener lugar en solución acuosa pueden producirse también en solventes no polares, en cuyo caso se denomina a los agregados que se forman "micelas inversas" por contraposición a las micelas normales. En las micelas inversas, las moléculas de tensoactivo se orientan con los restos polares hacia el interior de la misma, donde se aloja el agua o los compuestos polares. Las cadenas hidrofóbicas se sitúan hacia el exterior donde se encuentra el solvente apolar. Aunque la mayoría de los tensoactivos pueden formar micelas normales o inversas según el solvente en que se encuentren y gracias a su carácter anfifílico, el diisooctilsulfosuccinato sódico (AOT), el cloruro de bencilcetildimetilamonio (BDC) y el propionato de dodecilamonio (DAP), son ejemplos claros de tensoactivos que dan lugar a micelas inversas.

En la FIGURA 14 se muestran las disposiciones de micelas normales e inversas. Cabe resaltar el hecho de que el valor del radio en las micelas inversas puede alcanzar valores muy superiores al de las micelas normales (entre 15 y 80 Å) [1976 JACS 2391] [1977 JACS 4730].

Dado que una de las características más significativas de los medios micelares es su capacidad de englobar o asociar solutos en la fase micelar, consideraremos brevemente las posibles localizaciones de los solutos en las micelas. En el caso de las micelas normales

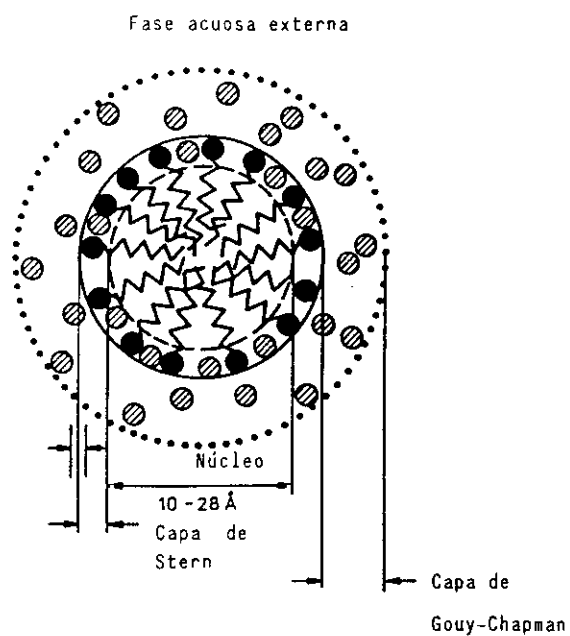


FIGURA 13: Representación esquemática de una micela cargada con su atmósfera iónica

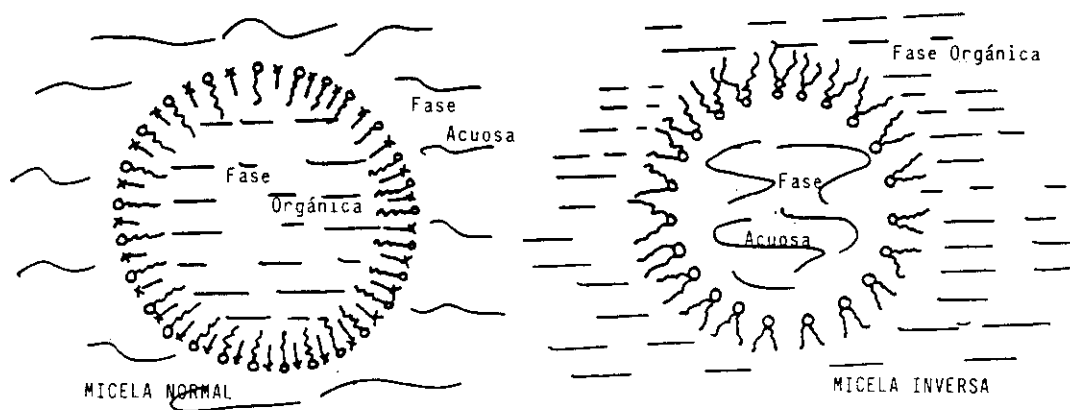


FIGURA 14: Disposición de los monómeros de tensoactivo en las micelas normales e inversas

el soluto puede quedar retenido en la superficie micelar, confinado en la región próxima al corazón de la micela o en el interior de la micela propiamente dicho tal y como se representa en la FIGURA 15. Sin embargo, estas tres posiciones están menos definidas si se consideran los movimientos de entrada y salida de los monómeros de la micela [1978 JPC 2805].

Ha de tenerse en cuenta además que muchos solutos poseen dimensiones semejantes a las de los monómeros del tensoactivo y por tanto es imposible dar una localización precisa en la micela. No obstante pueden admitirse dos posibles localizaciones: en el interior de la micela próximo a la superficie o en la superficie en la vecindad con la fase acuosa externa, según dominen los efectos de interacción hidrofóbica o electrostática entre el soluto y el medio micelar.

II.B.2.3 TECNICAS INSTRUMENTALES

En los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de las propiedades físicas de los agregados micelares, gracias a que se puede disponer de técnicas instrumentales antaño conceptuadas como muy laboriosas y complicadas (dispersión neutrónica y rayos-X) y que en la actualidad se pueden considerar de rutina en laboratorios especializados. El interés es creciente dado que cada día surgen nuevas utilidades industriales de tensoactivos de nueva síntesis y la caracterización y análisis de los mismos requiere el empleo de metodologías apropiadas [1987 L XXII].

Un medio micelar queda caracterizado por una serie de parámetros moleculares, entre los que se encuentran la concentración micelar crítica, el número de agregación, el radio micelar, la forma de la micela y también parámetros termodinámicos, como son la entalpía y la capacidad calorífica del proceso de micelización, los cuales son dependientes de la temperatura. Finalmente, hay que considerar los parámetros físicos, como la permeabilidad y flexibilidad de la micela, la microviscosidad y la micropolaridad local. Todos estos parámetros definen las propiedades estáticas y dinámicas de los agregados micelares.

Las técnicas instrumentales inicialmente empleadas para el cálculo de la CMC y del número de agregación fueron la conductimetría y la osmometría. Ya en 1908, McBain

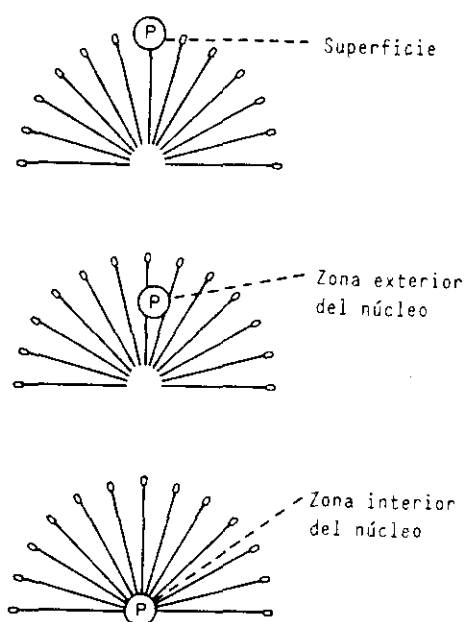


FIGURA 15: Posibles localizaciones de un fluoróforo P en las diferentes regiones de una micela.

[1911 ZPC 179] estableció la existencia de agregados micelares mediante medidas conductimétricas y osmométricas.

Las **medidas conductimétricas** se basan en que la capacidad para conducir la corriente eléctrica de una solución de tensoactivo que contiene únicamente monómeros, difiere notablemente de la conductividad una vez que se ha producido el fenómeno de agregación. Esta técnica se puede emplear con éxito en el caso de soluciones diluidas que presenten un valor de CMC relativamente bajo [1971 EA 689], ya que si la fuerza iónica del medio es elevada no se puede observar el fenómeno de agregación.

La **osmometría** permite el cálculo de la CMC y el número de agregación gracias a la variación de los coeficientes osmóticos con la concentración molal de tensoactivo [1979 L XXIII]. Las técnicas de "punto de congelación" [1981 CJC 1865] y la de "presión de vapor" son muy útiles, si bien ésta última no es exacta a concentraciones inferiores a 0'1 molal a pesar de que la actual instrumentación permite que se descienda a concentraciones más bajas [1981 JSC 181].

Las **técnicas de dispersión**, en sus diferentes modalidades (REM UV y visibles, rayos-X y neutrones) se emplean en la elucidación del tamaño, forma y propiedades de las micelas. Si una radiación electromagnética monocromática plano polarizada atraviesa un volumen V que contiene N partículas, se produce un fenómeno de dispersión. Para que ésto ocurra, es necesario asimismo que la longitud de onda de la REM incidente sea de dimensiones similares a las de las partículas que se van a estudiar. Se puede determinar la forma y tamaño de los agregados observando la variación en el coeficiente de difusión al variar la concentración de tensoactivo [1980 L XXIV]. Cardan ha estudiado mediante esta técnica el efecto que tiene el incremento de la fuerza iónica del medio sobre los valores de la CMC del dodecil sulfato sódico (SDS), observando que se produce un aumento en el valor del número de agregación y del radio iónico. Esto implica un cambio en la forma de la micela que pasa de ser esférica a ser anisodiamétrica [1984 JPh 1263]. Este efecto se observa también en el caso de las micelas de bromuro y cloruro de alquil trimetil amonio [1983 JPC 1409]. Igualmente se ha descrito la influencia que la longitud de la cadena hidrocarbonada ejerce sobre la forma de la micela, mediante las técnicas de difusión cuasielástica de la luz [1982 JPC 2388].

Las técnicas modernas de dispersión de rayos-X y dispersión de neutrones constituyen una valiosa ayuda a la ya clásica espectroscopia de dispersión de la luz y permiten seguir la evolución del sistema desde los monómeros, pasando por las micelas esféricas y las de tipo alargado (rod-like) hasta alcanzar un sistema polidisperso [1985 JPC 2996]. Asimismo, el estudio de las micelas de SDS mediante la dispersión de neutrones [1985 JP 2161] permite la caracterización de los sistemas estudiados con una resolución de 5 Å.

La **espectroscopia Raman** proporciona una valiosa información sobre el grado de empaquetamiento y ordenación de las cadenas alquílicas en el interior de la micela [1972 JACS 1109] [1973 BBA 245] [1975 BCSJ 2264] [1976 JPC 1462]. Las bandas de 1064 y 1124 cm^{-1} correspondientes a la vibración de tensión C-C, indican el grado de agregación de la estructura, pudiendo observarse los cambios de fase de las micelas esféricas a micelas de tipo alargado en el caso de los tensoactivos catiónicos. En el caso de los tensoactivos no iónicos, la espectroscopia Raman pone de manifiesto que los que son de cadena larga presentan un arrollamiento helicoidal (caso del Brij-35), mientras que en los de cadena corta como el Triton X-100 el arrollamiento es abierto.

Las **espectroscopias de luminiscencia molecular** en sus vertientes de fluorimetría y fosforimetría, proporcionan una valiosa información no sólo sobre las características fisico-químicas de estos agregados, sino también acerca de las propiedades dinámicas del sistema [1974 JPC 190] [1976 L XXV]. Los primeros estudios utilizan la mejora de la intensidad de fluorescencia o del rendimiento cuántico de la rodamina [1947 JACS 679] para el cálculo de la CMC. Es muy frecuente el uso de marcadores de fluorescencia como el pireno carboxaldehído [1977 JPC 2176] para obtener información acerca de la polaridad de la superficie micelar. El pireno [1977 ACR 133] es útil en el estudio de la polaridad interna micelar. Asimismo, un análogo del pireno, el dipirenil propano, se ha empleado en los estudios de microviscosidad de micelas gracias a la particularidad de este compuesto para formar excímeros. La relación de intensidades de fluorescencia excímero/monómero está intimamente relacionada con la viscosidad [1978 CPL 429].

Los fenómenos de amortiguación de fluorescencia (quenching) de pireno/cetilpiridinio [1984 JCIS 152] y Ru(II) bipiridinio/metil antraceno [1978 JACS 5951], son también útiles para la determinación del número de agregación de numerosos sistemas

micelares. De especial interés es la determinación del grado de empaquetamiento de las cadenas alquílicas o la rigidez micelar mediante el empleo de técnicas de polarización de fluorescencia [1978 JACS 984].

Al igual que en las técnicas de luminiscencia se emplean marcadores fluorescentes para explorar las características de la micelas, en **espectroscopia de resonancia de espín electrónico** se emplean marcadores de espín con este propósito [1972 JCIS 145] [1973 JCSFT 1321] pudiéndose detectar las especies con pares de electrones desapareados. Por ello es una técnica muy útil para el estudio de las especies paramagnéticas y de las reacciones en las que intervienen radicales libres. Entre los primeros marcadores de espín utilizados, destaca el catión radical de la clorpromazina [1942 N 992]. Con posterioridad se introdujeron los radicales de nitróxido y sus derivados [1962 N 472] [1964 TL 1775] que presentan una relativa estabilidad y simplicidad en la interpretación de los espectros. Los radicales de nitróxido pueden adoptar distintas orientaciones dependiendo de la estructura micelar. Este hecho ha permitido el estudio exhaustivo de las micelas de SDS y CTAB. El marcador intercalado entre las moléculas de tensoactivo en la micela presenta una distinta movilidad según el entorno [1968 JPC 4129] [1980 BCSJ 975].

Las variaciones en el valor del desplazamiento químico de determinadas señales en **espectroscopia de resonancia magnética nuclear** (RMN), permiten el estudio de las características de los medios micelares mediante esta técnica, cuya gran ventaja radica en su gran versatilidad aunque tiene como contrapartida su baja sensibilidad. Las diferentes metodologías de análisis del desplazamiento químico [1966 ACS 2019] [1972 JPC 1460] y relajación [1965 TFS 182] [1973 JACS 4871] facilitan los estudios de los equilibrios de asociación en micelas, del tamaño y forma de los agregados, la hidratación, los enlaces de los contraiones, la estructura de la solución y los equilibrios de solubilización.

Los estudios por RMN sobre la solubilización de moléculas aromáticas en micelas [1974 JACS 7869] [1977 JPC 2176] ayudan a establecer la localización de dichas moléculas, ya sea en el interior o en la superficie micelar. Así el pireno y sus derivados, ácido pireno sulfónico y ácido pireno butírico, tienen una localización diferente en las micelas de CTAB. El pireno provoca un gran desplazamiento químico de los protones de los grupos metileno del tensoactivo; por el contrario el ácido pireno sulfónico y el pireno butírico causan la modificación de los desplazamientos químicos del metilo del

agrupamiento N-CH₃, siendo el efecto más marcado en el caso del pireno sulfónico. Este hecho demuestra que el pireno se localiza en el interior mientras que los derivados ácidos (más polares) se localizan en la superficie micelar. Estudios complementarios llevados a cabo por espectroscopia de fluorescencia molecular ponen de manifiesto que los derivados más polares de pireno como el pireno sulfónico, se localizan en la superficie por contraposición al pireno que puede quedar englobado en el interior de la micela [1966 JPC 2138] [1969 B 2742].

No tan habituales pero no por ello sin utilidad, son las técnicas basadas en la **birrefringencia eléctrica** que ponen de manifiesto la existencia de los agregados micelares de tipo cilíndrico (rod-like), demostrando que la longitud del agregado es proporcional a la raíz cuadrada de la diferencia entre la concentración de monómero y la CMC del tensoactivo [1981 JPC 1418].

Entre las técnicas electroquímicas empleadas en el estudio de los agregados micelares, destacan la polarografía clásica y la potenciometría con electrodos selectivos de iones. La **técnicas polarográficas** se ha empleado para el cálculo de la CMC [1981 ZC 28]; asimismo, dado que estas técnicas proporcionan datos sobre los coeficientes de difusión, permitiendo el cálculo del tamaño micelar gracias a la determinación de los coeficientes de difusión de las especies electroactivas que se oxidan o se reducen frente a un electrodo de gotas de mercurio [1972 JCIS 424].

La potenciometría con **electrodos selectivos** constituidos por moléculas de tensoactivo, se ha utilizado para determinar la concentración de los iones de tensoactivo libre (monómeros) presentes en los sistemas micelares. La respuesta del electrodo debe ser sensible en un amplio intervalo de concentraciones por debajo de la CMC y además debe ser selectivo al tensoactivo en presencia de otros posibles iones interferentes. Existen electrodos sensibles a las concentraciones de tensoactivos tanto aniónicos como catiónicos. Estos electrodos de membrana [1959 JPC 650] [1974 BCSJ 3165] [1975 BCSJ 2755] [1978 JCIS 590] [1981 BCSJ 3128] normalmente utilizan como electrodo de referencia el de calomelanos. También existen electrodos sensibles formados por un electrodo de referencia (calomelanos, AgCl) y un electrodo metal/tensoactivo, por ejemplo, níquel/alquilcarboxilato de níquel [1968 IJC 140] o plata/decanoato de plata [1979 JCIS 68].

Los medios micelares y los tensoactivos han sido objeto de atención por sus aplicaciones en las industrias química y farmacéutica [1964 L XXVI] [1977 L XXVII], desempeñando un singular papel en los procesos de solubilización [1968 L XX] así como en la catálisis de reacciones orgánicas en medios heterogéneos [1973 L XXVIII] [1975 L XXIX], las cuales en ciertos casos recuerdan a la catálisis enzimática [1970 APOC 271] [1973 PBC 1]. Con respecto a la reactividad se ha estudiado su influencia en la catálisis de reacciones fotoquímicas y almacenamiento de energía por esta vía [1977 CPL 542] [1977 L XXX]. Igualmente constituyen un modelo muy adecuado para el estudio de agregados más complejos como es el caso de las biomembranas [1973 L XXIa] [1980 JPC 1485] [1982 L XXXI].

Las aplicaciones analíticas de los medios organizados están íntimamente relacionadas con la capacidad de solubilizar a los analitos. El empleo de tensoactivos puede evitar procesos de extracción líquido-líquido, haciendo más rápido y sencillo el análisis [1985 ACA 1] [1986 Ta 697]. Asimismo se mejora la sensibilidad de las determinaciones por espectrofotometría de absorción UV-VIS y espectrofluorimetría [1982 AL 221] [1984 TAC 143] [1986 Ta 697], permitiendo la observación de fosforescencia a temperatura ambiente en medios fluidos [1980 AC 754] [1981 AC 437] y la mejora de las condiciones de separación cromatográfica [1981 AL 1659] [1984 JLC 1273].

Muchas de las aplicaciones de las micelas residen en el hecho de que son capaces de solubilizar compuestos insolubles o débilmente solubles en agua, gracias a la incorporación del compuesto orgánico en su interior. Así pues, en términos generales, podemos decir que la solubilización es un fenómeno en el cual se asocia el soluto orgánico (solubilizado) a la estructura micelar. Como se indicó en el apartado II.B.1, las moléculas orgánicas hidrofóbicas inducen fenómenos de estructuración de las moléculas de agua a su alrededor lo que indica que el cambio de entropía que acompaña a la disolución es negativo. Dado que todo sistema químico tiende al estado de mínima energía libre, los monómeros de tensoactivo se agregan dando lugar a un descenso del valor de ΔG . Una vez que se ha formado el agregado, los compuestos insolubles se unen a las micelas, quedando englobados por ellas y por tanto solubilizados. La solubilización se produce para una concentración superior a la CMC del tensoactivo, por lo que el seguimiento del proceso

de solubilización constituye un método para la determinación del valor de la CMC. El proceso de solubilización conlleva la recuperación de las características químicas del compuesto en solventes orgánicos de polaridad menor que la del agua.

La solubilización gracias al empleo de tensoactivos conlleva mejoras muy apreciables en la elaboración de determinadas formas farmacéuticas. Así pues, numerosos medicamentos tales como, bactericidas, vitaminas liposolubles, esteroides, antibióticos y aceites esenciales, se formulan empleando agentes tensoactivos que facilitan la solubilización del principio activo, mejorando su estabilidad y actividad farmacológica. Por ejemplo, el Triton WR 1339 y el Tween 80 se han utilizado en la solubilización de esteroides en colirios; los éteres de polietilenglicol también se han empleado en la solubilización de vitaminas A,D y E, como alternativa a los ésteres (mono-caprato, caprato, palmitato, linoleato...) del retinol y la vitamina D, debido a la actividad hemolítica que presentan estos últimos y que es más elevada que la establecida para los tensoactivos no iónicos [1959 JPSJ 988].

Los sistemas micelares proporcionan un entorno en el cual las moléculas pueden reaccionar, mostrando un comportamiento bastante diferente del que pueden exhibir en medio acuoso. Estos medios organizados permiten el desarrollo de reacciones entre compuestos de características muy diferentes, en cuanto a hidrofobicidad/hidrofilia gracias a la solubilización de los reactivos. De otro modo estas reacciones se desarrollarían con extrema dificultad. Por tanto, la velocidad de reacción puede modificarse [1973 L XXVIIIa] [1984 AC 1132] y en la mayoría de los casos lo que se busca es una mejora, llegando a incrementarse la velocidad de la reacción en tres órdenes de magnitud. Igualmente se pueden disminuir sensiblemente las reacciones secundarias y desplazar los equilibrios redox y ácido-base con mayor efectividad que en los medios homogéneos.

Se han observado efectos tanto positivos como negativos sobre la catálisis, debido probablemente al incremento de la concentración local de los reactivos o los productos, los cuales se acumulan en el interior de la fase dispersa micelar o en la interfase [1980 JACS 3188] [1980 JPC 1491]. Sin embargo esta no es la única razón que explica los efectos catalíticos. Han de tenerse en cuenta otros parámetros físico-químicos como la polaridad, la viscosidad, la concentración de iones en la interfase y la estabilización de los intermedios de reacción [1975 IC 2993]. Asimismo, hay que tener en cuenta los efectos

de orientación [1979 NJC 487] y las interacciones específicas entre los reactivos y las cabezas polares de los tensoactivos (dipolo-dipolo, formación de puentes de hidrógeno etc..).

Thomas [1980 CR 283] atribuye la mejora en la velocidad de reacción a varios factores. En primer lugar las micelas solubilizan a los reactivos en el propio volumen micelar, muy reducido, incrementándose así las concentraciones locales y por tanto la velocidad de la reacción. En segundo lugar, la interfaz micela/medio acuoso posee propiedades tales que ejercen una influencia significativa en la reacción. Así pues, el campo eléctrico local en la superficie micelar (iónica) es superior a 10^6 V/cm [1964 JCIS 722] [1967 ACIS 241]. Tales campos eléctricos pueden variar los estados de transición de muchas reacciones. Como ejemplos de la mejora de reacciones en medios micelares tenemos los de la formación de complejos entre iones metálicos y tetrafenilporfirina [1975 IC 2990] [1975 IC 2993], la fotorreducción sensibilizada de la clorofila en presencia de rojo de metilo y ascorbato [1980 JPC 1495] o la formación de los correspondientes isoindoles entre OPA (*o*-ftaldialdehído) y aminas de elevado peso molecular insolubles en agua [1986 ACA 179]. Los reactivos pueden interaccionar en una interfaz muy amplia, del orden de 100-1000 m²/g.

Muchas de las reacciones mejoradas en presencia de los medios micelares son reacciones que se inducen por vía fotoquímica. Estos procesos aparecen resumidos de forma esquemática en la FIGURA 16. En el proceso I, los reactivos se distribuyen de forma favorable en el interior de la micela, debido a su carácter hidrofóbico. La excitación por vía radiante conduce a la formación de los productos. En el proceso II, los reactivos A (hidrofóbico) y C (hidrofílico) se encuentran en distintas fases; para que se desarrolle la excitación por vía radiante debe conducir a A^{*} y así mismo a la penetración de C en la micela. En el proceso III, la excitación da lugar a una transferencia de electrones entre A y B, que se encuentra parcialmente solubilizado en la micela. La carga de la micela producirá efectos de repulsión o atracción sobre B. En el proceso IV, la excitación por vía radiante de A, conduce a la formación de un radical libre (A^{*}), para posteriormente desprenderse de un electrón que pasa a la fase acuosa externa.

Así, determinadas reacciones fotoquímicas pueden mejorarse de forma extraordinariamente selectiva mediante el empleo de medios micelares apropiados.

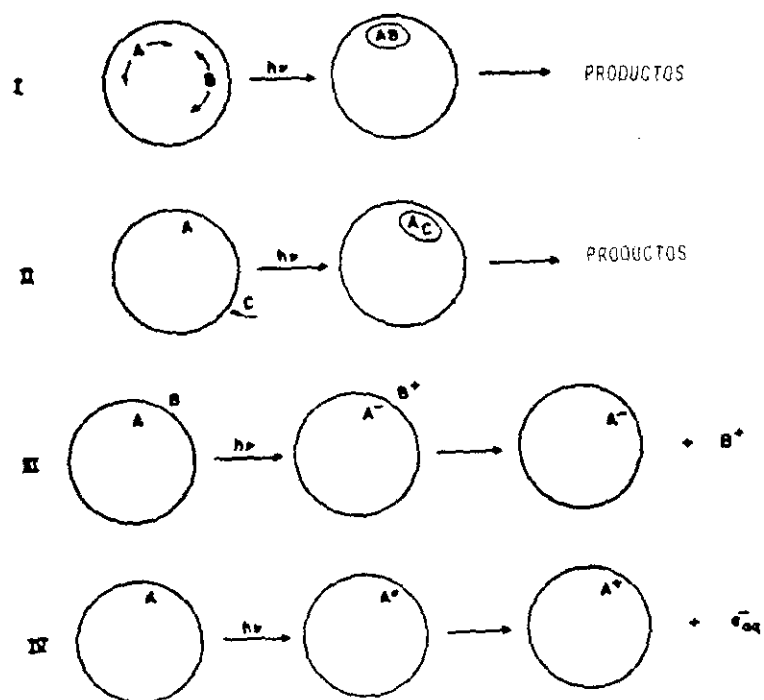


FIGURA 16: Distintas reacciones inducidas por vía fotoquímica en el seno de los medios micelares..

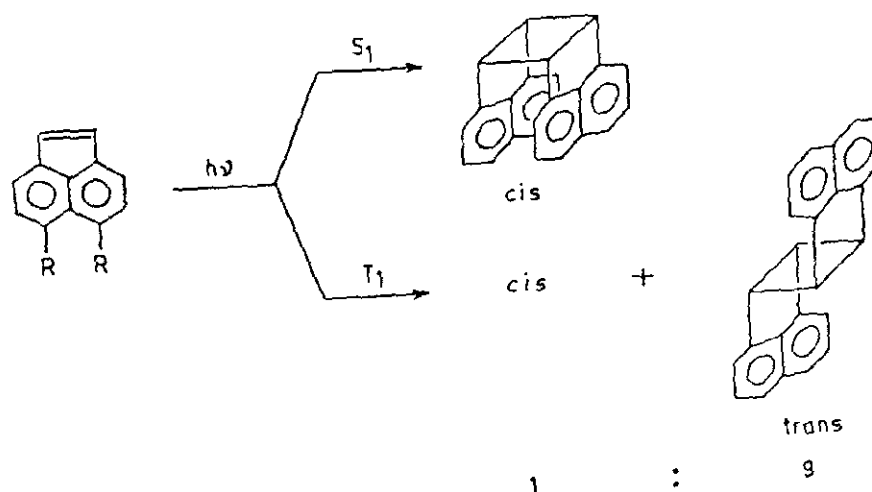


FIGURA 17: Fotodimerización del acenaftileno.

Mediante el uso de micelas con distintos tipos de contraiones es posible obtener una gran selectividad en ciertas reacciones fotoquímicas. La irradiación de acenaftileno (FIGURA 17) conduce a la fotodimerización [1967 CB 3146] [1970 JACS 6286], originándose el isómero *cis* si la reacción transcurre vía singulete excitado S^* , mientras que si la reacción camina vía triplete excitado T^* se obtiene una mezcla de los isómeros *cis* y *trans* (1:9). Esta fotodimerización es sensible a la presencia del átomo pesado externo [1974 JACS 1229] [1975 JACS 249] y la presencia de yoduro de etilo en el solvente conduce a la formación mayoritaria del isómero *trans*. La irradiación, en presencia de distintos medios micelares, conduce a la formación mayoritaria del isómero *cis* en el caso del SDS y del Triton X-100. En el caso de los tensoactivos catiónicos CTAB y CTAC, disminuye la proporción de isómero *cis* siendo especialmente significativa en el caso del CTAB, probablemente debido al efecto de los contraiones bromuro [1984 JP 395].

La isomerización de los 4-hidroxiestilbenos [1986 JP 239] o la dimerización de antracenos [1984 JP 37] sustituidos en el seno de medios micelares, provoca cambios en las características físicas del medio, es decir variaciones en la viscosidad según el fotoproducto originado, el cual se asocia de distinta manera a la micela. Como queda reflejado en la FIGURA 16, el proceso III implica la catálisis en los procesos de transferencia de carga de los medios micelares. La elección del tensoactivo es crucial ya que éste debe favorecer la formación de iones y la separación de cargas. En efecto, la excitación de aminopireno (AP) y benzoquinona (BQ) en el seno de SDS, origina AP^+ y BQ^- [1977 CPL 542]. Con este mismo tensoactivo se consigue la reducción sensibilizada del azul de metileno (AM) en presencia de 10-dodecil naranja de acridina (DAO) que actúa como sensibilizador. La reducción transcurre a través de un proceso de transferencia de energía singulete-singulete de DAO^+ a AM^+ y por un proceso de transferencia electrónica triplete-triplete de DAO^+ a AM^+ [1985 JP 363]. Sensibilizador y reactivo experimentan una interacción muy favorable con el entorno micelar debido a su carácter catiónico.

En todos los casos los medios micelares son cruciales ya que favorecen la existencia de especies en estado excitado durante un tiempo lo suficientemente largo como para que se produzca la reacción. También ayudan a la solubilización de las especies hidrofóbicas (arenos, colorantes, porfirinas, clorofilas), organizándolas en la proximidad de su entorno para facilitar la transferencia electrónica. Estos procesos de transferencia de electrones se ven en general favorecidos por entornos polares como puede ser el agua. La

excitación por vía radiante conduce en determinadas ocasiones a la ionización de la molécula que se está estudiando, proceso que se conoce como "fotoionización". Estos procesos se ven muy favorecidos en el seno de soluciones de tensoactivos (proceso IV FIGURA 16). Se ha descrito la fotoionización del pireno en distintos solventes, conduciendo a la formación de cationes areno [1970 JPC 4137] [1972 JCP 3649]. En el caso de las micelas, el catión pireno permanece en el interior de la micela, mientras que el electrón es expulsado al exterior; esto es debido a que la superficie negativa de la micela se interpone entre cationes y electrones, originando una separación eficaz de las cargas. Por regla general, los sistemas micelares reducen la energía necesaria requerida en los procesos de fotoionización. Citaremos como ejemplo el fenotiazeno [1976 JACS 5723], la tetrametilbencidina [1976 JACS 5349] y el aminoperileno [1978 JACS 3239], que son ionizados en el seno de medios micelares, reduciéndose la energía necesaria para la fotoionización en aproximadamente un 50% (de aproximadamente 6'5 eV en fase gaseosa a 3'0 eV en medios micelares).

Algunas aplicaciones analíticas del empleo de tensoactivos, residen en la capacidad de solubilización de sustancias lipófilas evitando determinados procesos de extracción, así como en la solubilización de compuestos que poseen cromóforos. Se sabe que por regla general los tensoactivos aumentan los valores de los coeficientes de absorción molar de numerosos compuestos orgánicos y de complejos metálicos coloreados. Igualmente incrementan la sensibilidad de las determinaciones analíticas en espectrofluorimetría y permiten la observación de fosforescencia a temperatura ambiente, lo cual facilita la manipulación de las muestras y también la utilización de esta técnica en análisis de rutina.

Los medios micelares presentan características singulares dado que pueden interaccionar con los solutos, a través de fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas. Desde el punto de vista de las determinaciones espectrofluorimétricas sobresalen las siguientes características:

- Solubilizan, compartimentalizan y concentran/separan analitos y/o reactivos.
- Modifican el microentorno que rodea al analito asociado y/o incluido.
- Modifican el rendimiento cuántico de fluorescencia ϕ_f .

- Varían las velocidades de procesos químicos y fotofísicos.
- Desplazan los equilibrios químicos.
- Además, hay que destacar que los medios micelares son estables, ópticamente transparentes, fotoquímicamente estables, baratos y relativamente no tóxicos.

La mayor ventaja desde el punto de vista analítico es la mejora en la sensibilidad de la espectrofluorimetría y la disminución de las interferencias. La mejora en la sensibilidad se explica por varias razones. Así, el primer efecto que se observa es un aumento en la solubilización del compuesto hidrofóbico. En general cada micela solubiliza una única molécula, por lo cual esta queda aislada del entorno donde pueden existir sustancias interferentes y amortiguadoras de fluorescencia. Igualmente, el aislamiento de una molécula mediante una micela evita la formación de excímeros, favoreciendo por tanto la emisión fluorescente del monómero.

El incremento de la viscosidad local en el medio micelar favorece la emisión fluorescente porque disminuye el "quenching" por vía colisional. La amortiguación de fluorescencia debida al oxígeno disuelto es mayor en el caso de los solventes orgánicos que con el agua, dado que la solubilidad del O_2 en agua es mucho menor. El descenso de la polaridad local en las micelas, facilita la disolución del oxígeno y por tanto al incrementarse su concentración en dicha región [1985 JCIS 194] se producirá amortiguación. Este fenómeno se comprueba si se compara el distinto comportamiento de los fluoróforos pireno y los ácidos pireno butírico y pireno sulfónico en el seno de microemulsiones y SDS. Así, mientras que el pireno es muy sensible a la amortiguación de fluorescencia por parte del O_2 , debido a su localización en el interior de la micela (hidrofóbica), sus homólogos ácidos experimentan un débil fenómeno de amortiguación debido a su localización en la superficie micelar, más hidrofílica y donde la concentración de O_2 es mucho menor [1980 JACS 3188] [1980 JPC 1491]. Esta protección de los estados excitados por parte de los medios micelares conlleva mejoras en la sensibilidad que hacen descender los límites de detección entre 20 y 50 veces [1982 Ta 397] [1983 A 1386]. Por otro lado, disminuyen las interferencias debido a que protegen a las moléculas de los compuestos interferentes presentes en la fase acuosa externa. Por regla general, los tensoactivos aniónicos protegen de los interferentes aniónicos y los catiónicos de los

cationes debido a los fenómenos de repulsión electrostática. Los tensoactivos no iónicos deben proteger de ambos tipos de interferentes iónicos.

Por estas razones se han empleado distintos tensoactivos tanto catiónicos como no iónicos, para incrementar la sensibilidad en la determinación fluorimétrica de compuestos orgánicos como el pireno y otros hidrocarburos aromáticos [1982 A 1073] [1983 AL 241], así como en la determinación fluorimétrica de metales mediante el uso de reactivos orgánicos fluorescentes [1984 ACA 159] [1984 Ta 361] [1985 AC 1681] [1972 AL 637] [1974 MJ 26] [1983 A 1386] [1986 AC 2161]. Los medios micelares también se han utilizado para mejorar las determinaciones en otras técnicas de luminiscencia alternativas, como por ejemplo la quimioluminiscencia [1984 AL 251] o el fluoroinmunoanálisis [1984 Ta 909], así como en la determinación de compuestos aminados mediante su reacción con ortoftaldialdehído (OPA), incrementándose el rendimiento cuántico de fluorescencia de los derivados obtenidos [1986 ACA 179] [1990 ACA 187].

En esta línea de mejora en la sensibilidad de las determinaciones analíticas e incremento de la reactividad en el seno de los medios microscópicamente organizados, se ha propuesto [1990 ACA 181] el empleo de vesículas obtenidas a partir de tensoactivos sintéticos, como es el bromuro de didodecildimetilamonio. Estas vesículas se organizan y comportan de forma análoga a las membranas biológicas y se propone su utilización para la mejora en la determinación fluorimétrica de aluminio, ya que además de incrementar la sensibilidad pueden favorecer la reactividad del agente quelante y del analito.

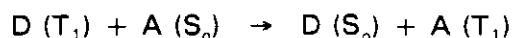
Es quizás en el campo de la **fosforimetría**, donde el empleo de los tensoactivos y los medios micelares estabilizados, ha adquirido un papel de singular relevancia. La dificultad para observar fosforescencia a temperatura ambiente se debe a la extremada sensibilidad de los estados triplete excitado frente a la amortiguación por el oxígeno disuelto y otras especies paramagnéticas presentes en solución, lo cual implica la necesidad de utilizar soluciones vitrificadas con N_2 líquido (77 K) con el fin de evitar la difusión del oxígeno en solución.

Los sistemas micelares facilitan la existencia de tripletes excitados de tiempo de vida largos, además de proteger de los amortiguadores presentes en el solvente. Y dado

que solubilizan una molécula por micela, inhiben las interacciones entre las moléculas en estado excitado y las moléculas en estado fundamental que desactivan los estados excitados. A Kalyanasundaram [1977 CPL 501] y a Almgren [1979 JACS 279] se deben los primeros estudios que permiten la observación de fosforescencia a temperatura ambiente en soluciones fluidas. Estos hechos fueron confirmados posteriormente por otros autores [1978 CPL 207] [1978 PP 523].

Cline Love [1980 AC 754] [1980 AC 1559] [1981 AC 437] [1981 AC 1872] [1983 SpA 1421] [1984 AC 327] fue quien primero demostró la utilidad analítica de los medios micelares/fosforescencia a temperatura ambiente (MS/RTP) para la determinación de una amplia gama de compuestos orgánicos, entre ellos hidrocarburos aromáticos policíclicos (fenantreno, criseno, fluoreno, benzo[a]pireno...), bifenilo, así como compuestos con actividad farmacológica. En el seno de distintos medios micelares, generalmente dodecilsulfato sódico, se observa fosforescencia, lo cual está favorecido por la presencia de contraiones como Ti^+ y Ag^+ que favorecen el cruce entre sistemas y la emisión vía triplete. La adición de átomos pesados, generalmente halógenos, favorece la emisión fosforescente y ha demostrado tener una utilidad analítica significativa. En estas condiciones, los límites de detección hallados para diversas sustancias alcanzan valores de 10^{-8} a 10^{-10} M.

De Luccia [1984 AC 2811] ha demostrado la posibilidad de observar fosforescencia sensibilizada a temperatura ambiente gracias a que las micelas favorecen el fenómeno de transferencia de energía. El bifenilo fosforesce a temperatura ambiente en condiciones apropiadas. La transferencia de energía desde el triplete excitado de un donador al bifenilo, puede resumirse así:



siendo D el donador (compuesto que se va a analizar) y A el aceptor (bifenilo).

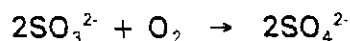
En consecuencia, a través de la medida de fosforescencia del bifenilo puede determinarse la magnitud de la emisión fosforescente del analito (donador). La transferencia de energía ha de producirse en un solvente adecuado, acetonitrilo, metanol

o agua, que no interfiera con el proceso desactivando los estados triplete excitado [1981 Ta 717] [1982 AC 891]. Se ha demostrado que la eficacia del proceso de transferencia de energía aumenta cuando la reacción transcurre en un medio microscópicamente organizado, ya sean medios micelares o ciclodextrinas.

Por regla general, los heterociclos nitrogenados exhiben una fosforescencia más débil en el seno de medios micelares que sus homólogos carbocíclicos. Sin embargo no existen razones aparentes o intrínsecas para que esto sea así. Los derivados de carbazol fosforescen intensamente en el seno de los medios micelares a los que se ha adicionado átomos pesados para favorecer el acoplamiento espín-órbita, y por tanto la emisión vía triplete [1981 JPC 2047]. El talio y la plata también se emplean como favorecedores de la fosforescencia debido a su efecto de átomo pesado externo. El incremento en la fosforescencia se explica gracias a la formación de un complejo de transferencia de carga entre el nitrógeno heterocíclico y el talio [1984 SpA 643].

Al igual que los medios micelares favorecen la emisión fluorescente de quelatos metálicos, se incrementa también la emisión fosforescente de los citados quelatos, lo que permite la determinación cuantitativa de metales mediante fosforimetría [1987 AC 774] [1988 ACA 235] [1988 MA 269]. Los resultados obtenidos en cuanto a límites de detección y precisión para el Al y Nb son comparables a los obtenidos por espectroscopia de absorción atómica con cámara de grafito.

La metodología analítica necesaria para observar fosforescencia a temperatura ambiente implica en muchos casos la desoxigenación de las muestras, recurriendo ya sea al vacío o bien borboteando un gas inerte (N₂ o Ar) a través de la solución. Además del tiempo que consume, esto conlleva la formación de espuma en el caso de los medios micelares. Recientemente se ha propuesto [1986 AC 1436] el empleo de sulfito sódico como agente secuestrante del O₂ en solución, ya que se producirá la siguiente reacción:



La ausencia de O₂ favorece la emisión fosforescente y la metodología del trabajo es sencilla y permite una fácil manipulación.

La sensibilidad en la detección fluorimétrica o fosforimétrica de compuestos tras su separación por HPLC se ve incrementada mediante la adición de tensoactivos a la fase móvil, lo cual no sólo incrementa la sensibilidad sino que además conlleva una mejora en las características de la separación ya que el tensoactivo puede modificar la polaridad del compuesto que se quiere separar [1982 AC 1552] [1984 AC 327] [1984 AC 1557].

La **electroforesis capilar** (CZE) es una técnica de reciente introducción en el campo del análisis de compuestos de bajo peso molecular [1981 AC 1298] [1981 JHRCCC 230], pero que guarda similitud con la electroforesis de zona convencional en cuanto a su fundamento. Esto es, la separación de los portadores de carga se realiza bajo la acción de un campo eléctrico externo. Sin embargo, su disposición instrumental, la eficacia en las separaciones (número de platos teóricos) y las aplicaciones analíticas cuantitativas, son en todo punto comparables con la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

La limitación principal de la electroforesis capilar con respecto al HPLC, es que a priori sólo puede aplicarse a compuestos portadores de carga, ya que las partículas no cargadas se moverán todas a la misma velocidad, que viene impuesta por el flujo electroosmótico [1982 JC 241] [1985 JHRCCC 407]. Aunque la electroforesis capilar es una poderosa técnica de separación para especies iónicas, los iones pequeños que no poseen grandes diferencias en su carga y por tanto en su movilidad electroforética no presentan una resolución adecuada. Por ello, la adición de tensoactivos aparece como un método alternativo que hace portadoras de carga a las especies que no lo son [1984 AC 111] o incrementa la carga neta global en las débilmente cargadas, mejorando su separación [1985 JC 39] [1987 AC 1021] [1989 JC 55].

La adición de tensoactivos en concentración superior a la CMC conlleva la inclusión de los compuestos hidrofóbicos al interior de la micela, constituyendo un mecanismo efectivo de separación. Así, la separación de los solutos neutros se basa en su diferente distribución en la fase acuosa y en el interior de la micela, la cual está cargada y migrará a una velocidad electroforética dada. El mecanismo de separación es el mismo que el del HPLC con fase móvil micelar [1964 KZZP 143] [1981 AC 1662], en el cual las micelas

pueden ser consideradas como una "pseudofase". De esta forma, la separación se basa en un proceso de distribución entre tres fases, la fase estacionaria, la fase micelar y la fase móvil (acuosa), en la cual las micelas migran con el agua, constituyendo una pseudofase móvil gracias a la velocidad impuesta por el campo eléctrico externo [1984 AC 113].

De hecho, el empleo de medios micelares mejora también la separación de compuestos cargados, por lo que a esta técnica se la denomina **cromatografía capilar electrocinética micelar** (MECC) término acuñado por Taraba [1984 AC 111] y Burton [1986 JCS 347] para diferenciarlo de la electroforesis capilar (CZE), ya que el mecanismo de separación está basado en fenómenos de partición tanto como en la movilidad electroforética. Esta metodología ha permitido la separación y cuantificación, mediante detección fluorimétrica, de derivados de vitamina B₆ empleando SDS como tensoactivo [1986 JCS 347], de catecoles no ionizables mediante el empleo de SDS igualmente [1988 JC 299], de oligonucleótidos portadores de carga por la vía de formación de pares iónicos con iones metálicos y SDS [1987 AC 1021], así como de péptidos tras la reacción con OPA y fluorescamina e inclusión de los derivados obtenidos en micelas, tanto de tipo aniónico (SDS) como catiónico (bromuro de dodeciltrimetilamonio). La adición de estos tensoactivos conlleva una mayor resolución cromatográfica, esto es picos más estrechos y una mejora significativa en la intensidad de fluorescencia [1990 JC 189].

II.B.3 COMPLEJOS DE INCLUSION

II.B.3.1 INTRODUCCION Y CLASIFICACION

El término "Einschlussverbindung" esto es "complejo de inclusión" fue acuñado por Schlenk en 1950. Desde entonces se han empleado los términos, aducto, clatrato, compuesto molecular, criptato y complejo de inclusión, existiendo numerosas revisiones bibliográficas acerca de la formación de los mismos [1962 L XXXII] [1964 L XXXIIIa] [1975 JPS 1585].

Los compuestos de inclusión poseen la estructura característica de un aducto, en la cual uno de los compuestos incorpora y aloja espacialmente a otras moléculas. Estas moléculas huéspedes ocupan la cavidad sin afectar a la estructura de las moléculas que las incluyen. En la mayoría de los casos el tamaño y la forma de la cavidad no se modifica

con la formación del complejo de inclusión, salvo una ligera deformación. Aunque las moléculas huéspedes no se modifican químicamente en un sentido estricto, tras la formación del complejo de inclusión, muchas de las propiedades físicas dependen fundamentalmente de las características de la molécula que las incluye. Puede afirmarse que el complejo de inclusión formado tras la interacción de las dos moléculas difiere de ambas en su geometría y enlace químico. Para que tenga lugar la interacción han de confluir ciertos requerimientos. Así, los lugares de interacción o sitios de unión de las moléculas huéspedes y las que las incluyen, han de ser complementarios en el sentido estereoelectrónico.

Según Szejtli [1982 L XXXIV], los complejos de inclusión pueden clasificarse atendiendo bien al agente que forma el complejo, bien al tamaño de la cavidad, pudiendo originarse complejos de inclusión en solución o en estado cristalino, aunque algunos compuestos tales como las ciclodextrinas pueden formar ambos tipos de complejos. Los compuestos de inclusión en estado cristalino pueden clasificarse en :

- Verdaderos clatratos [1964 L XXXIIIb] en los cuales las moléculas huéspedes están aprisionadas en cavidades cerradas discretas o cajas, como por ejemplo los clatratos de β -hidroquinona.
- Complejos tipo "canal" [1964 L XXXIIIc], en los que las especies incluidas se acomodan en canales que dejan libres la estructura cristalina. Estos complejos de inclusión los forman la urea y la tiourea por ejemplo.
- Complejos tipo "capa" [1976 JACS 1601], donde las moléculas huéspedes se sitúan entre los bordes o capas de las moléculas acomplejantes. Los complejos que forma el grafito atrapando moléculas en su interior son un ejemplo de este tipo de disposición.
- Las zeolitas [1976 ACR 121] forman complejos de inclusión pero presentan la peculiaridad de poseer cavidades comunicadas a través de canales. En la FIGURA 18 se representa gráficamente la disposición espacial de los complejos cristalinos anteriormente comentados. Estas disposiciones pueden ser adoptadas por los complejos cristalinos de ciclodextrina.

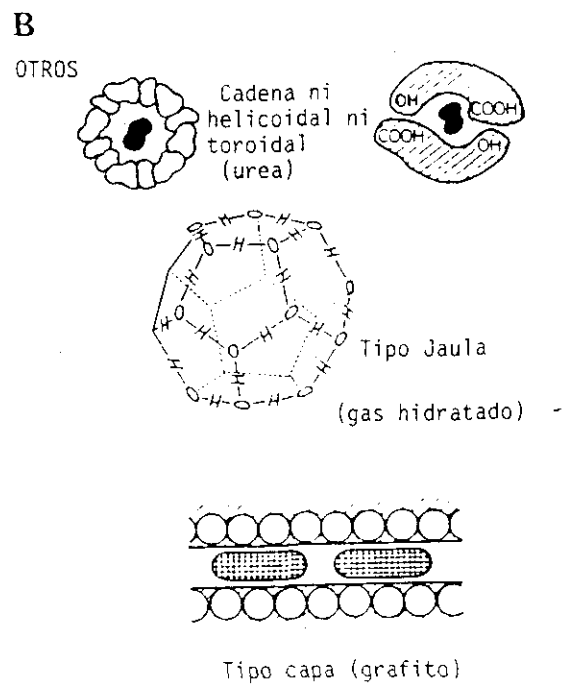
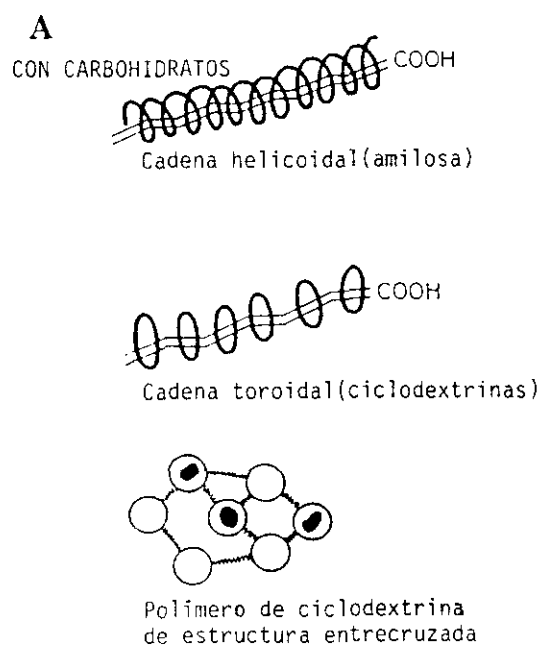


FIGURA 18: Tipos de complejos de inclusión. (A) con carbohidratos, (B) con otros compuestos.

- Por otra parte las ciclodextrinas y en general los carbohidratos pueden dar lugar a disposiciones de tipo "toroide" o de "enlaces cruzados" como en el caso de los carbohidratos no cíclicos como la amilosa, pudiendo adoptar una estructura tipo "hélice".

Si bien es cierto que existe un renovado interés por el estudio de la formación de complejos de inclusión en estado sólido, hemos de señalar que la formación de complejos de inclusión en medios fluidos suscita aún mayor interés por un doble motivo. Primero, porque la gran mayoría de las reacciones químicas transcurren en solución y la formación de estos complejos puede ser fundamental para la catálisis de ciertas reacciones como se comentará más adelante; segundo, porque dado que una de las características imprescindibles para la formación de estos aductos moleculares es la complementariedad estereoelectrónica entre las moléculas huéspedes y las que las incluyen, puede afirmarse que muchos de los compuestos capaces de incluir en su cavidad moléculas huéspedes, muestran un comportamiento tal que podrían denominarse "receptores artificiales o sintéticos" lo que permite profundizar en los estudios teóricos y de modelización de los receptores presentes en los organismos vivos.

La inclusión de compuestos por parte de moléculas huéspedes en solución, incluye moléculas de origen natural, como por ejemplo, ciclodextrinas [1965 L XXXV] [1967 Nw 625] [1973 AIC 209], y de síntesis como los éteres corona [1972 AgC 16] [1974 CR 351] [1974 S 803] [1976 Sy 168] o ciertos cavitandos, etc... que comentaremos más detalladamente en el apartado siguiente. Estas moléculas son capaces de interaccionar con una gran variedad de especies químicas tanto iónicas como moleculares, como es el caso de los éteres corona que incluyen especies iónicas en solución. El segundo aspecto abarca el estudio de compuestos de inclusión multimoleculares en estado cristalino [1954 L XXXVI] [1962 L XXXII] [1970 L XXXVII] [1975 JPS 1585].

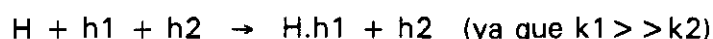
II.B.3.2 EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR

II.B.3.2.1 INTRODUCCION

El reconocimiento molecular es la base de numerosos procesos bioquímicos, aunque en los últimos años ha sido objeto de atención por parte de los químicos físicos y los

químicos orgánicos; los primeros, interesados en los distintos tipos de interacción implicados en el fenómeno y los segundos, volcados hacia el diseño y síntesis de moléculas capaces de "reconocer" a otras moléculas [1981 L XXXVIII] [1982 L IXL] [1984 L XL] [1984 L XLI] [1987 L XLIIa] [1986 CSR 63] [1988 ACIEE 362].

El "reconocimiento" se lleva a cabo a través de la formación de un complejo reversible entre las moléculas orgánicas de gran tamaño y distintas especies químicas de tamaño mucho más reducido (las moléculas huéspedes). Para cualquier pareja de moléculas la distinción se basa entre otras razones en el valor de las constantes de asociación, como se expresa a continuación:



H : molécula que incluye

h : molécula huésped

II.B.3.2.2 EL RECONOCIMIENTO MOLECULAR EN SISTEMAS BIOLOGICOS

Las moléculas biológicas que incluyen a otras son generalmente proteínas de elevado peso molecular, tales como enzimas, receptores y anticuerpos. También el enlace selectivo de ciertos oligonucleótidos a una secuencia apropiada y complementaria de polinucleótidos en el DNA o el RNA, es un buen ejemplo del reconocimiento molecular entre distintas moléculas de interés biológico.

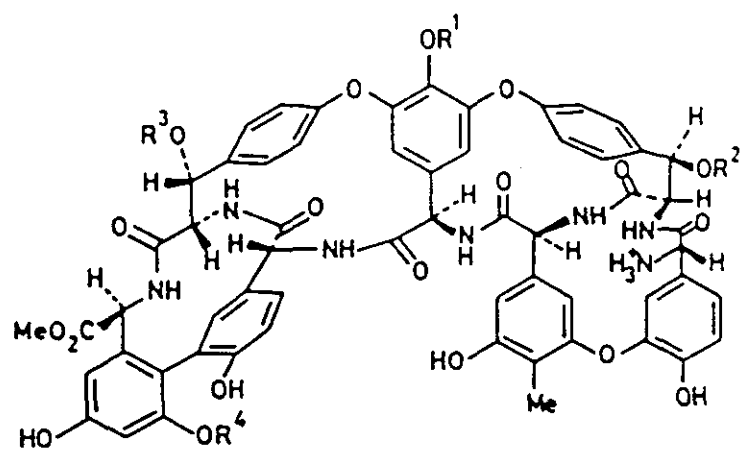
Las reacciones enzimáticas transcurren en medios acuosos, en los cuales la proteína proporciona un entorno apolar al sustrato. El reconocimiento enzimático se lleva a cabo por el conocido mecanismo de la "llave-cerradura". No obstante, en la selección específica de un sustrato el modelo de la llave-cerradura no es suficiente para explicar tal especificidad.

Factores tales como cambios conformacionales, el ajuste del sustrato en la cavidad e interacciones por fuerzas no covalentes (enlaces por fuerzas de Van der Waals, iónicas, por puentes de hidrógeno) están en estrecha relación con la variación de la energía libre (ΔG). Las diferencias en los valores de ΔG para dos moléculas huéspedes constituye una forma de expresar la especificidad del enlace enzima-sustrato. Diferencias de 1 a 2 kcal en el valor de ΔG son suficientes para explicar la formación de uniones o su ausencia. La naturaleza del mecanismo enzimático de interacción es esencialmente un proceso de equilibrio que transcurre favorablemente disipando energía. Por tanto, puede demostrarse que la especificidad del proceso enzimático transcurre a través de la selección de una serie de equilibrios subsiguientes con un error inferior al 10% [1985 Bi 7014], razón por la cual, por ejemplo, dos aminoácidos, valina e isoleucina, que difieren únicamente en un grupo metilo, pueden ser reconocidos específicamente.

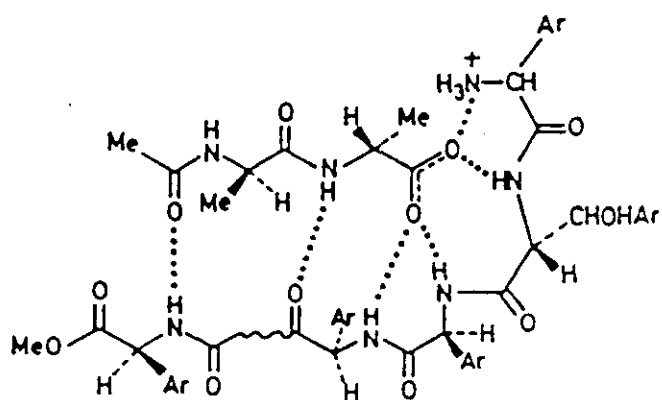
Un nivel de reconocimiento superior es el que se produce en las células vivas. Existen determinados "factores de adhesión", para los que existen ciertas dificultades en su identificación a nivel molecular [1986 SA 32]. Igualmente, en la pared celular se localizan ciertas proteínas de membrana que tienen propiedades de lectinas, las cuales se unen a azúcares de forma altamente específica. Por el momento no está claro el papel de estas glicoproteínas de membrana [1983 L XLIII], si bien se sabe que son un factor condicionante en la agregación celular o en los procesos de metástasis de las células cancerígenas [1985 CTR 9]. En cualquier caso, existe un alto grado de reconocimiento molecular entre azúcares y proteínas en el que la interacción entre ambos tipos de moléculas transcurre gracias a la formación de puentes de hidrógeno, como se ha podido demostrar mediante estudios de rayos-X [1986 ARB 287].

II.B.3.2.3 RECONOCIMIENTO MOLECULAR POR MOLECULAS PEQUEÑAS

Si bien son muy numerosas las moléculas de interés biológico que actúan gracias al reconocimiento molecular, sin embargo son pocos los compuestos de origen natural y de bajo peso molecular los que se comportan como moléculas capaces de incluir a otras de forma selectiva. Cabe citar como ejemplo al grupo de los antibióticos ionóforos [1981 L XLIV] y algunos derivados de vancomicina, como la ristocetina [1980 JACS 897]. En la FIGURA 19 se muestra el enlace basado en la formación de puentes de hidrógeno entre la ristocetina y las especies huéspedes acetil-D-alanina-D-alanina.



(1)



(2)

FIGURA 19: Reconocimiento molecular por moléculas de interés biológico. (1) Estructura química de la ristocetina, (2) Estructura esquematizada de la unión por puentes de hidrógeno entre la ristocetina y la acetil-D-alanina-D-alanina.

Las interacciones hidrofóbicas que tienen lugar en los procesos de reconocimiento molecular son óptimas en el caso de los solventes polares como el agua. En el caso de moléculas orgánicas relativamente pequeñas, la organización de las interacciones hidrofóbicas es la fuerza conductora de la unión. En el caso de las ciclodextrinas esta organización está bien demostrada [1981 JACS 154], lo mismo que ocurre en el caso de otras moléculas de síntesis como los ciclofanos [1983 L XLV] [1983 L XLVI].

II.B.3.2.3.1 ÉTERES CORONA

Algunos autores consideran que los éteres corona descubiertos por Pedersen [1967 JACS 2495] y desarrollados por Cram y col. [1981 L XXXVIIIa], son los compuestos de peso molecular más reducido capaces de formar complejos de inclusión y reconocer iones dentro del campo de la química de las interacciones entre el huésped y la molécula que lo incluye. Los éteres corona y sus derivados forman complejos con cationes metálicos y sales de amonio cuaternario, entre otras especies. El enlace se produce mediante interacciones electrostáticas, aunque en el caso de las sales de amonio cuaternario también se establecen uniones por puentes de hidrógeno [1982 JACS 3249] [1984 JACS 5947].

Las estructuras de 18-corona-6 sin sustituir, son incapaces de reconocer diferencias en el tamaño del sustituyente alquílico R de la sal de amonio cuaternario [1978 JCSCC 386] [1981 L XLVII]. Esto es debido a que en ausencia de barreras físicas para la complejación, el contacto entre el éter corona y la molécula huésped es limitado. Para evitar este bajo reconocimiento se han modificado los éteres corona sustituyendo O por N; son los éteres diazo corona [1985 JCSCC 311]. Sin embargo, el grado de reconocimiento no es muy alto debido probablemente a que las cavidades son flexibles y pueden abrirse o plegarse para acomodar cationes de tamaños muy diversos.

II.B.3.2.3.2 CAVITANDOS

En la búsqueda de nuevas moléculas que lleven a cabo un "reconocimiento molecular" y cuyo comportamiento sirva de modelo para el estudio del reconocimiento en sistemas biológicos sobresalen los cavitandos (FIGURA 20). Los cavitandos son compuestos orgánicos de síntesis que poseen cavidades amplias, capaces de alojar moléculas pequeñas o iones. Su superficie interna es cóncava y puede ser diseñada con

una gran variedad de formas para atrapar y enlazar a moléculas huéspedes que posean sitios de unión y formas complementarias [1982 JACS 5826] [1983 JCSCC 101].

Entre otros cavitandos citaremos a los [Oⁿ]-*m*-ciclofanos, que son cavidades formadas por unidades de benceno alineadas [1970 CB 1132], los esferandos, cuya característica es que los pares de electrones están alineados en la cavidad [1982 JCSCC 301], los calixarenos que son cavidades formadas por radicales tolilo [1982 JACS 3782], y los *o*-ciclofanos [1981 JCSCC 1137] y los *m*-ciclofanos, cavidades constituidas por restos arilo, metileno y oxígeno alineados. Todas estas moléculas pueden considerarse receptores sintéticos versátiles e interesantes [1983 S 1177] capaces de formar complejos con moléculas orgánicas generalmente aromáticas en estado sólido [1992 JIPMRC 87], en solución [1989 JCSCC 500] y en fase gaseosa [1992 JACS 445].

En los últimos años, el interés por estos compuestos ha aumentado notablemente y se han sintetizado nuevos macrociclos de tipo ciclofano, en su mayoría hidrosolubles y con distintos sustituyentes alineados tales como dibenzofurano sustituidos [1983 JCSCC 101], tetrazapara-ciclofanos [1980 JACS 2504], espiropiperidiniopara-ciclofanos [1984 JACS 8025] y otros, en los que algunos de los anillos aromáticos se han sustituido por heterociclos [1992 JOC 4608]. Estas modificaciones se han introducido con la finalidad de mejorar el proceso de formación del complejo en medios acuosos. Todos estos compuestos que se comportan como receptores artificiales, aunque son hidrosolubles, poseen cavidades hidrofóbicas y sitios de unión selectiva a moléculas huéspedes apolares. Las interacciones hidrofóbicas constituyen la "fuerza conductora" en el proceso de formación del complejo y por ello guardan una gran semejanza con los sistemas biológicos.

Aunque distintos estudios llevados a cabo con diferentes técnicas espectroscópicas sugieren la posibilidad de formación de complejos de inclusión con sustratos hidrofóbicos en solución acuosa [1976 JACS 5727] [1976 TL 3327] [1977 BCSJ 3365] [1979 JCSPT 1560] [1979 JCSPT 1669], no puede hablarse de formación de compuestos de inclusión en el sentido de que la molécula huésped quede englobada en el interior de una cavidad cerrada. Se ha observado una mejora considerable en la fluorescencia del 1,8-ANS tras la formación del complejo con un derivado de tetraazapara-ciclofano, lo cual hace pensar que el marcador fluorescente ha sido transferido al entorno no polar de la cavidad con el consiguiente cambio conformacional. La existencia del complejo también se ha demostrado

por técnicas de difracción de rayos-X, aislándolo de la solución acuosa [1980 JACS 2504].

II.B.3.2.3.3 CICLODEXTRINAS

El reconocimiento molecular por parte de ciclodextrinas se basa en su capacidad para formar complejos de inclusión de forma selectiva con huéspedes según su tamaño y su disposición molecular, así como en la estabilidad de los complejos formados. Dicha estabilidad puede definirse por el valor de las constantes de asociación del complejo.

La α -CD forma un complejo con clorobenceno pero no con bromobenceno. Sin embargo, la β -CD forma un complejo con bromobenceno, pudiendo afirmarse que existe un reconocimiento de los compuestos aromáticos sustituidos por las distintas cavidades de las ciclodextrinas. Aquí el ajuste "llave-cerradura" puede entenderse en términos geométricos. Si la energía de enlace para la formación del complejo es un proceso termodinámicamente favorable, la complejación tendrá lugar. Se sabe que la velocidad de formación de los complejos con colorantes azoicos depende del tamaño de los sustituyentes y por tanto del impedimento estérico y de la configuración espacial de la molécula que se va a incluir. Así, en la serie de sustituyentes: -H, -CH₃, -CH₂-CH₃, la velocidad de formación del complejo descende unas cien veces para cada sustituyente con respecto al anterior [1967 JACS 14].

La principal ventaja del reconocimiento molecular por ciclodextrinas es que éstas son compuestos de origen natural con una baja toxicidad, solubles en agua, por lo que pueden utilizarse como modelos de reacción enzimática y en procesos de catálisis, por ejemplo en las reacciones de descarboxilación de ácidos acéticos sustituidos [1965 JACS 1115], la hidrólisis de pirofosfatos [1965 JACS 1121] y otros compuestos semejantes [1979 JACS 1614] [1980 JACS 421] [1980 JACS 1152] [1980 JACS 2115].

Algunas ciclodextrinas modificadas catalizan reacciones que podrían calificarse de catálisis "tipo enzimática", mediante la introducción de determinados grupos catalíticos. Entre estos tenemos las imidazolil ciclodextrinas (FIGURA 21). El radical imidazol favorece la actividad esterásica de las ciclodextrinas [1970 CB 2138]. Asimismo, la hidrólisis del p-nitrofenilacetato es unas 300 veces más rápida en presencia del derivado imidazólico que

en medio acuoso. Aunque esta actividad catalítica está lejana de la que presentan las enzimas, las cuales pueden incrementar la velocidad de reacción aproximadamente 10^5 veces o más, continúa la búsqueda de nuevas ciclodextrinas que presenten mejoras en la actividad catalítica [1984 T 552] y en la especificidad en la formación de los complejos.

II.B.3.3 CICLODEXTRINAS

II.B.3.3.1 INTRODUCCIÓN

Las ciclodextrinas, cicloamilosas o cicloglucanos fueron descubiertos por Villiers en 1891 [1891 CRASP 536]. Sin embargo su descripción, preparación y aislamiento se debe a Schardinger en 1903 [1903 ZUNG 865] [1904 WKW 207], por lo que durante mucho tiempo se denominaron "dextrinas de Schardinger" y han sido objeto de atención e investigación desde entonces hasta la actualidad debido a sus singulares características químicas. Se aislaron como productos de degradación del almidón, obteniéndose un polvo blanco y cristalino fácilmente recrystalizable en forma pura. Inicialmente se sugirió para estos oligosacáridos una estructura cíclica, al no poder hallar los grupos terminales con los medios analíticos disponibles entonces. Fue necesario esperar a los años 50 para llevar a cabo la determinación exacta de su peso molecular [1948 ZN 464] [1950 CB 296] y confirmar su estructura cíclica mediante difracción de rayos-X [1948 ZN 464] [1952 HBM 124], momento a partir del cual pasaron a denominarse ciclodextrinas. La característica común de las ciclodextrinas es su capacidad de formar complejos de inclusión tanto en estado sólido como en solución. La idea de que una molécula pueda "envolver" a otra formando un nuevo compuesto (aducto, complejo de inclusión) no fue aceptada hasta que se demostró, mediante difracción de rayos-X, la formación de un complejo de inclusión entre la α -ciclodextrina y el yodo [1951 CB 855] [1954 CB 806] [1980 AgC 344].

Desde la aparición de la primera monografía sobre ciclodextrinas [1954 L XXXVI] hasta la actualidad, han surgido una multitud de libros y artículos que profundizan en el tema [1987 L XLII] [1978 L XLVIII] [1982 L XXXIV], especialmente a causa de las múltiples aplicaciones y utilidades potenciales que se han descubierto para estos compuestos, que si bien son muy amplias y variadas tienen como nexo común la formación de complejos de inclusión.

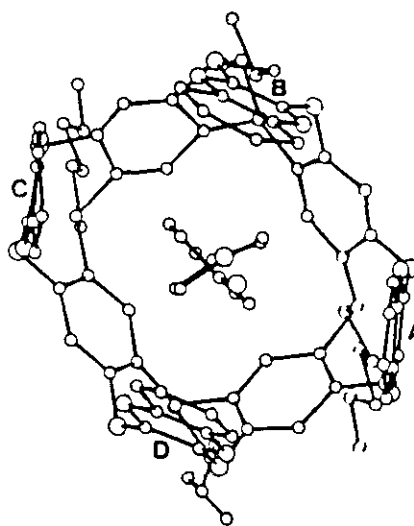


FIGURA 20: Estructura molecular obtenida por difracción de rayos-X de un modelo de cavitando.

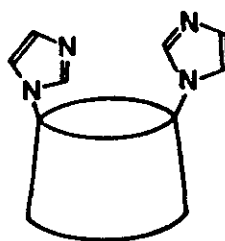


FIGURA 21: Diagrama esquemático de una 6,6'-bis imidazolil-CD.

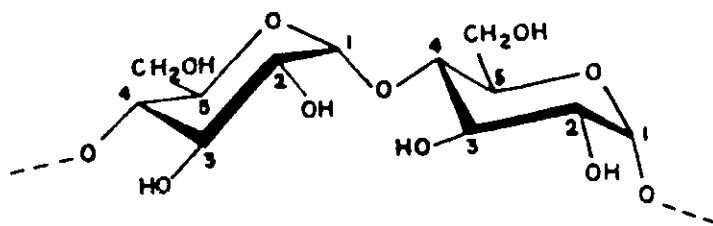


FIGURA 22: Diagrama esquemático de las moléculas de glucopiranosas unidas mediante enlaces glicosídicos α -(1,4).

II.B.3.3.2 ORIGEN Y OBTENCIÓN DE LAS CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas se obtienen por la acción de la amilasa del *Bacillus macerans* sobre el almidón, dando un crudo que contiene α -, β - y γ -CD, junto con pequeñísimas cantidades de otras ciclodextrinas de mayor número de unidades de glucosa [1955 AnnC 81] [1958 CB 308]. La α -, β - y γ -CD (ciclohexaamilosa, cicloheptaamilosa y ciclooctaamilosa respectivamente) pueden separarse del crudo de reacción por precipitación selectiva mediante la adición de determinados solventes orgánicos.

Hasta ahora se han aislado la α -, β -, γ - [1935 AnnC 102] y δ -CD [1949 JACS 353] [1961 BBRC 11] [1965 ABB 153]. Además de estas, la ϵ -, ζ -, η - y θ -CD se han obtenido mediante purificación por cromatografía en columna, junto con otros análogos de cadena abierta. Por otra parte, no se conocen ciclodextrinas con menos de seis unidades de glucosa, probablemente debido al impedimento estérico [1970 CaR 351]. Estos compuestos se pueden obtener por síntesis orgánica [1957 ACC 189] [1980 ACIEE 344] aunque también puede lograrse su obtención mediante biosíntesis [1987 L XLIIb], gracias a la cual se obtienen considerables mejoras en los procesos de producción y purificación, por lo que la producción a escala industrial de estos compuestos resulta más económica. El proceso requiere la obtención del enzima, la cicloglicosil transferasa, que actúa sobre el almidón previamente seleccionado. Asimismo, se llevará a cabo la determinación cuidadosa del medio de cultivo y los análisis de las características fisicoquímicas de los enzimas. De esta manera puede controlarse el proceso de producción de las ciclodextrinas obteniéndose muy buenos resultados.

II.B.3.3.3 NOMENCLATURA

Es muy corriente encontrar en las referencias antiguas [1957 ACC 189] el término "dextrinas de Schardinger" para aludir a lo que denominamos ciclodextrinas. Algunos autores también se refieren a estos compuestos como cicloglucanos, pero quizás la denominación de cicloamilosa [1973 AIC 209] es la alternativa más utilizada en la nomenclatura de las estas moléculas, utilizándose muy frecuentemente desde 1930 hasta la actualidad. Sin embargo, el Chemical Abstracts ha adoptado la denominación de ciclodextrinas, por lo cual es la que actualmente se emplea.

A medida que la complejidad de los derivados ha ido creciendo, se ha hecho necesario establecer con precisión ciertas normas para la correcta denominación de los mismos, algunas de las cuales se mencionan a continuación. El nombre aceptado (ciclodextrina) puede utilizarse para denominar a los derivados sustituidos. Si la sustitución no es completa, se hace necesario indicar que grupo hidroxilo se ha sustituido y también sobre que residuo (s) de glucopiranososa ha tenido lugar la sustitución. Los sustituyentes se nombran por orden alfabético siguiendo las denominaciones de grupo y recomendaciones de la IUPAC.

Tanto los sustituyentes como las posiciones de sustitución sobre un residuo de glucosa dado, se indican entre paréntesis o corchetes. Se emplea un prefijo multiplicador (mono, di,..., hexa) para indicar el número de glucosas sustituidas, seguido del nombre aceptado de la ciclodextrina de origen. Así por ejemplo, un derivado de α -CD en el que se hallen acetilados los grupos hidroxilo se nombrará como: hexakis (2,3,6-tri-O-acetil)- α -ciclodextrina.

En ocasiones la denominación aceptada y trivial es insuficiente para designar con exactitud la estructura compleja de algunos derivados de ciclodextrina. En este caso es aconsejable consultar las recomendaciones de los Índices Colectivos del Chemical Abstracts [1983 T 1417].

II.B.3.3.4 GENERALIDADES ESTRUCTURALES Y PROPIEDADES

II.B.3.3.4.1 ESTRUCTURA

Las ciclodextrinas están formadas por distinto número de residuos de D (+) glucopiranososa, de conformación "silla", unidos mediante enlaces $\alpha(1-4)$, tal y como se representa en la FIGURA 22. La α -, β -, y γ -CD, (ciclohexamilosa, cicloheptamilosa y ciclooctamilosa) contienen respectivamente 6, 7 y 8 residuos de D(+) glucopiranososa. Sundarajan y Rao [1970 CaR 351] demostraron mediante cálculos conformacionales que no pueden existir ciclodextrinas con menos de seis miembros debido al impedimento estérico. Pulley y French [1961 BBRC 11] prepararon homólogos de mayor número de unidades de glucosa δ -, ϵ -, ζ - y η -CD. Sin embargo estos compuestos no se pueden precipitar de forma selectiva y a ello hay que añadir que su capacidad para incluir

compuestos en su interior es muy débil por lo que sus aplicaciones son mucho más reducidas [1965 ABB 153].

Las ciclodextrinas tienen aspecto de cono truncado, debido a la disposición espacial característica de los distintos grupos funcionales de las unidades de glucosa. Es esta disposición la que confiere sus características tan peculiares e interesantes. Así, como consecuencia de esta conformación, todos los grupos hidroxilo secundarios (correspondientes a los átomos de carbono C_2 y C_3 de las unidades de glucosa) se encuentran situados en uno de los bordes de la cavidad mientras que los hidroxilos primarios se encuentran en el otro extremo de la cavidad. La rotación de estos grupos -OH reduce el tamaño efectivo de la cavidad, haciendo que ésta posea un aspecto tronco-cónico más abierto hacia el lado de los hidroxilos secundarios tal y como se muestra de forma esquemática en la FIGURA 23.

Según esto podría decirse que estos macrociclos se "componen" de anillos a diferentes niveles, ordenados de mayor a menor diámetro. En un primer anillo se situarían los hidroxilos secundarios, el segundo anillo se formaría como consecuencia de los enlaces C-H de las unidades de glucosa, el tercer anillo estaría constituido por los O glucosídicos, el cuarto estaría formado nuevamente por uniones C-H y el quinto anillo correspondería a los hidroxilos primarios. Esta disposición proporciona al interior de la cavidad un carácter apolar, mientras que los bordes del tronco de cono son polares debido, a la presencia de los grupos -OH, lo que hace que estos compuestos sean muy hidrosolubles. Asimismo, los huéspedes de carácter hidrofóbico se alojarán en el interior de la cavidad a causa de las interacciones hidrofóbicas de tipo Van der Waals. Sin embargo también pueden establecerse interacciones con huéspedes polares gracias a la formación de puentes de hidrógeno con los -OH de los hidroxilos primarios.

La comparación de las estructuras cristalinas de α -, β - y γ -CD pone de manifiesto que estos compuestos deben su forma "redondeada" a la existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los hidroxilos secundarios -OH (C_2) y -OH (C_3) de los residuos de glucosa adyacentes. Estos puentes de hidrógeno contribuyen a estabilizar la estructura del anillo y al mismo tiempo le proporcionan una mayor rigidez. La existencia de estos enlaces de hidrógeno fue propuesta a raíz de los resultados cristalográficos obtenidos mediante rayos-X por Hylb [1965 JACS 2779] para los complejos de α -CD con

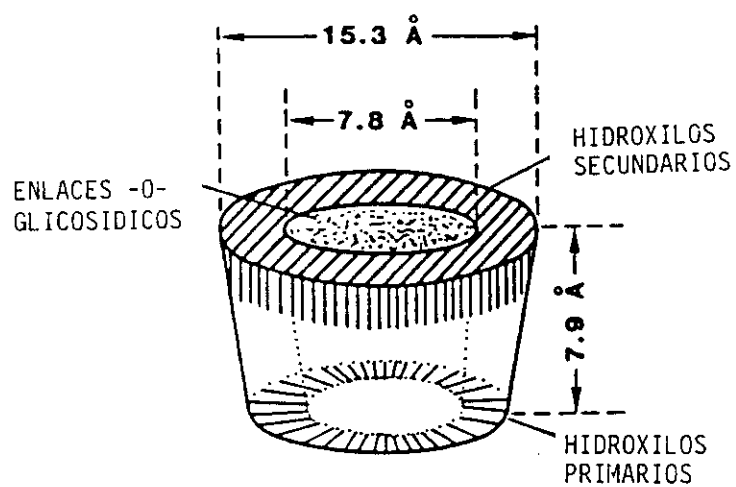


FIGURA 23: Esquema de la estructura de la β-CD.

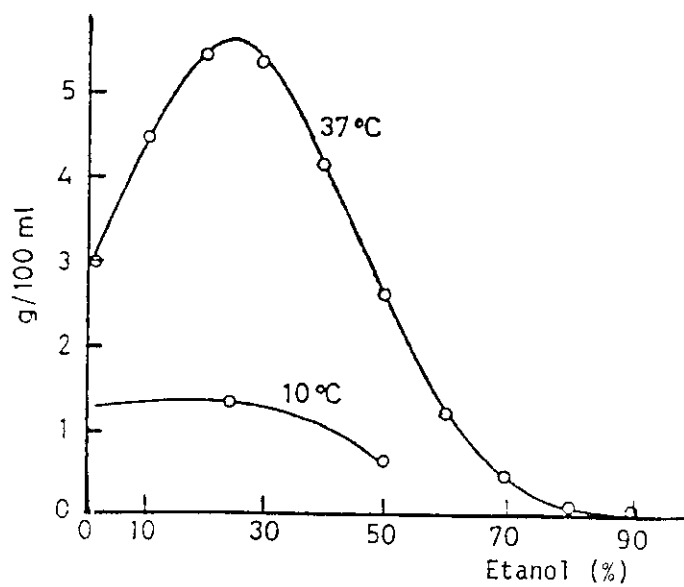


FIGURA 24: Solubilidad de la β-CD en soluciones etanol/agua.

acetato potásico, así como para β - y γ -CD [1968 ACry 1560] [1970 ABC 568] [1970 ABC 1787]. Estos datos cristalográficos fueron confirmados posteriormente mediante RMN protónica [1966 T 3061], ya que los protones correspondientes a los hidroxilos no anoméricos en la glucosa y otros azúcares donde se descarta la posibilidad de formación de enlaces hidrógeno aparecen, a δ entre 4 y 5 ppm. Sin embargo la formación de los puentes de hidrógeno conlleva un desplazamiento de las señales de estos protones hidroxílicos a valores de $\delta = 5.5$ ppm.

Según los cálculos de Sundarajan y Rao [1970 CaR 351], la existencia de los puentes de hidrógeno entre los hidroxilos secundarios hace descender la energía, en aproximadamente 20 kcal/mol, para la α -CD y 30 kcal/mol para la β -CD; de ahí su gran efecto estabilizador sobre la estructura del anillo. Estudios posteriores [1984 ICo 231] establecen que las distancias entre los oxígenos de los C_2 y C_3 varían para los distintos tipos de ciclodextrina.

Según esto, la distancia de enlace es mayor para la α -CD que para la β -CD, y ésta mayor que para la γ -CD. Por tanto, la interacción entre los hidroxilos secundarios en la α -CD es más débil que en la β -CD, y en ésta más débil que en la γ -CD, lo que implica una mayor flexibilidad del macrociclo para la α -CD y una mayor rigidez para la γ -CD. Si se comparan los espectros de RMN protónica de α -, β - y γ -CD [1970 ABC 1416] en DMSO- d_6 a 25°C y 80°C, se observa que las señales correspondientes a los protones de los hidroxilos secundarios aparecen desplazadas a campos más bajos para la α -CD que para la β -CD y más que para la γ -CD; ello implica que las uniones por puentes de hidrógeno son más fuertes en el caso de la γ -CD que para la β -CD y la α -CD [1966 DS 218] [1968 CS 217] [1968 DS 387]. El incremento de la temperatura desplaza las señales a campos más altos, lo cual refleja asimismo la debilidad intrínseca de estos enlaces de hidrógeno. Además parece que los puentes de hidrógeno intramoleculares no son tan determinantes para la estructura del macrociclo puesto que en las ciclodextrinas peracetiladas y permetiladas, en las cuales no existen los puentes de hidrógeno, las unidades de glucosa tienen la misma conformación y confieren la misma estructura al macrociclo que en las ciclodextrinas no modificadas [1968 T 803] [1970 CaR 150].

La α -, β - y γ -CD poseen energías libres más elevadas que sus correspondientes homólogos de cadena abierta y son del orden de +2.29 kcal/mol, +1.71 kcal/mol y 1.99

kcal/mol a 25°C [1957 ACC 189] [1972 JB 67]. Por tanto la ciclación es un proceso energéticamente desfavorable. En este proceso, el aumento de la entalpía es de +6'60, +4'41 y +4'40 kcal/mol para la α -, β - y γ -CD respectivamente, lo cual demuestra la inestabilidad introducida por el proceso de ciclación. Desde el punto de vista de la entropía, la ciclación es un proceso favorable, con valores de +14'4, +9'1, y +8'1 unidades de entropía para α -, β - y γ -CD. Este proceso resulta favorable gracias a la reorganización de las moléculas de agua alrededor de la cadena de glucosa en el proceso de ciclación [1972 JB 67].

II.B.3.3.4.2 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS EN SOLUCIÓN

Las ciclodextrinas no poseen un punto de fusión definido aunque por encima de 200°C empiezan a descomponerse. En general su densidad se sitúa entre 1'42 y 1'45 g.cm⁻³, según el tipo y la forma cristalina. Su solubilidad en agua varía según la ciclodextrina [1949 JACS 353] [1957 CB 2572] y por regla general se incrementa al elevarse la temperatura, de ahí que puedan ser recristalizadas en agua para su purificación. Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la dependencia de la solubilidad de las ciclodextrinas con ciertos agentes precipitantes [1957 CB 2561], así como con la temperatura [1967 CaR 318], sobre todo en el caso de la β -CD que es la menos soluble de todas [1968 CaR 1]. En general la solubilidad decrece en presencia de compuestos orgánicos [1961 JACS 2312], lo cual se atribuye a la formación de complejos de inclusión; sin embargo, en el caso del etanol y el propanol se produce un máximo en la solubilidad para determinadas concentraciones del alcohol. En la FIGURA 24 se muestra la variación de la solubilidad de la β -CD con la concentración de etanol.

Craig y Pulley [1962 B 89] estudiaron la difusión de las ciclodextrinas a través de membranas de acetato de celulosa, lo cual les permitió realizar el cálculo de las constantes de difusión que se reflejan en la TABLA IV.

Estos valores de los coeficientes de difusión permitieron a dichos autores establecer que, dado que el incremento en la vida media de diálisis para la α -, la β - y la γ -CD es lineal, la distorsión del anillo es insignificante, como en el caso de la γ -CD. Teniendo presente la vida media de diálisis de la maltohexosa, un análogo lineal, se puede concluir que este compuesto se encuentra ligeramente arrollado, adoptando una conformación que en cierto

modo se aproxima a la de las ciclodextrinas. La viscosidad de las soluciones acuosas de ciclodextrina apenas difiere de la del agua. Así por ejemplo, la viscosidad del agua a 25 °C es de 8.93 mP, mientras que la de una solución de α -CD (9.5×10^{-4} M) es de 8.99 mP y la de una solución de α -CD (9.9×10^{-3} M) es de 9.46 mP [1975 JACS 1209].

Entre sus características químicas podemos resaltar el hecho de que las ciclodextrinas no son reductoras, siendo la glucosa el único producto obtenido tras la hidrólisis de las ciclodextrinas y la 2,3,6-trimetilglucosa el único producto obtenido tras la metilación seguida de hidrólisis [1942 JACS 1651] [1950 JACS 5150]. Los pesos moleculares de las ciclodextrinas no modificadas son siempre múltiplos de 162, que es el peso molecular que corresponde a un único residuo de glucosa. En general dan positivas las reacciones de identificación características de los azúcares no reductores, desarrollando color en su reacción con la antrona. En la reacción de oxidación con el peryodato, las ciclodextrinas no originan ácido fórmico o formaldehído, lo que demuestra que estas moléculas no tienen extremos terminales libres. El consumo de peryodato es de una molécula por cada unidad de glucosa, de tal manera que tras un periodo de inducción, se incrementa la velocidad de oxidación. Sin embargo, en el caso de las dextrinas de cadena abierta no existe periodo de inducción para la oxidación peryódica [1950 JACS 5148].

Estas moléculas son bastante estables en solución alcalina; sin embargo se hidrolizan en medio ácido para dar glucosa y derivados de maltosacáridos lineales. La hidrólisis ácida de α -CD origina una mezcla de glucosa, oligosacáridos, maltohexosa y α -CD sin hidrolizar [1952 ACS 1186]. Parece ser que durante el proceso de hidrólisis, la fase inicial es mucho más lenta que durante las fases finales [1949 ACS 91] [1949 AK 129] [1949 JACS 353] [1949 JACS 356] [1957 JPoS 791]. Las constantes de velocidad de hidrólisis se elevan al incrementarse la temperatura; no obstante la vida media de estas moléculas sometidas a hidrólisis ácida es de aproximadamente 48 días. La energía de activación para la ruptura de un enlace glicosídico en una ciclodextrina es mayor que en un azúcar lineal; así la hidrólisis de la β -CD es unas dos o tres veces más lenta que la de la maltosa [1976 ACASH 73], probablemente debido a la ausencia de unidades de glucosa terminales en las ciclodextrinas [1976 ACASH 73]. Esto se ha demostrado al verificarse que la velocidad de hidrólisis se incrementa al aumentar el poder reductor de los azúcares en el transcurso de la reacción [1948 JBC 797] [1949 AK 129], y esto mismo explica el que la velocidad de hidrólisis se incremente en el transcurso de la reacción.

Ciclodextrina	Residuos de glucosa	Pm	% agua de cristalización	solubilidad en agua (g/100 mL)	Poder rotatorio específico $[\alpha]$	Constante de difusión a 40°
α -CD	6	972	10'20	14'50	150'5 \pm 0'5	3'443
β -CD	7	1135	13'20-14'50	1'85	162'5 \pm 0'5	3'224
γ -CD	8	1297	8'13-17'70	23'20	177'4 \pm 0'5	3'000

TABLA IV: Características físicas de las distintas ciclodextrinas.

Puesto que la mayoría de las reacciones en presencia de ciclodextrinas se producen en solución, y dado que su capacidad de incluir compuestos también se presenta en medios fluidos, fundamentalmente en agua, resulta imprescindible el conocimiento de las características químicas y físicas de estos compuestos en solución. Las conformaciones de estas moléculas en solución son muy semejantes a las del estado cristalino. A esta conclusión se llega a partir de los datos obtenidos mediante RMN protónica [1963 JPC 951] [1965 CJC 2652] [1968 T 803] [1970 ABC 1416] [1970 CaR 157], espectrofotometría de absorción IR [1968 T 803] [1964 JPoS 171] y espectroscopia de dispersión óptica rotatoria [1963 Bp 527] [1969 CB 494]. Así las unidades de D(+) glucopiranososa adoptan una conformación de silla en DMSO (dimetilsulfóxido) y D₂O, lo que implica que los grupos hidroxilo primarios y secundarios tengan una conformación similar a aquella que presentan en estado cristalino. Estudios más profundos por ¹H-RMN [1977 JACS 1735] demuestran que las 6 unidades de glucosa de la α-CD poseen idéntica conformación y que la molécula tiene simetría hexagonal.

El estudio de los intercambios hidrógeno-deuterio de estas moléculas en presencia de agua deuterada demuestra la existencia de puentes de hidrógeno intramoleculares. Se han determinado las constantes de equilibrio para la reacción:



en DMSO mediante ¹H-RMN, siendo las constantes de equilibrio para estos hidroxilos más pequeñas que para las correspondientes amilosas. Ello implica la existencia de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos secundarios y que estos son más fuertes puesto que son más resistentes a los intercambios H-D [1968 CS 217]. Este hecho también se puede confirmar por el ensanchamiento de la banda de tensión O-H de la ciclodextrina en DMSO que se obtiene por espectrofotometría de absorción IR [1966 T 3061]. Si existen estos enlaces de hidrógeno en presencia de DMSO, el cual normalmente rompe los puentes de hidrógeno entre los solutos, su presencia será más fuerte en el caso del agua. La rotación limitada de las moléculas de glucosa en la ciclodextrina es atribuible a la existencia de estos puentes de hidrógeno. Además el pK_a de estos hidroxilos descende de forma muy

significativa debido a la existencia de estos puentes de hidrógeno [1967 JACS 3253] [1968 JPS 44] [1970 RTCPB 845].

Para terminar con este apartado, nos ocuparemos de una de las propiedades más características de las ciclodextrinas en solución: su capacidad de incluir moléculas en el interior de su cavidad apolar. Para ello tomaremos como ejemplo la inclusión de una molécula sencilla, el agua. Saenger [1972 N 392] [1974 JACS 3630] describió la estructura de un complejo de α -CD con agua mediante difracción de rayos-X. Se trata de la estructura de α -CD hexahidratada, en la cual dos moléculas de agua se sitúan en el interior de la cavidad de α -CD, tal y como se muestra en la FIGURA 25. Las otras cuatro moléculas de agua se encuentran en el exterior del anillo de ciclodextrina. Esta estructura posee un singular interés debido a que una distribución semejante es aplicable a las estructuras de ciclodextrina en solución. Los datos de difracción de rayos-X se confirmaron con estudios de difracción de neutrones [1976 BioC 187] y esto permitió descubrir que los seis residuos de glucosa no son equivalentes. Así, se incluye una molécula de agua en el interior de la cavidad, lo que hace que uno de los residuos de glucosa (el 5) gire estableciendo un puente de hidrógeno con dicha molécula de agua a través de un hidroxilo primario. La segunda molécula de agua establece uniones por puentes de hidrógeno con la primera molécula de agua y con el grupo hidroxilo primario perteneciente al residuo 1 de glucosa. La distorsión del macrociclo como consecuencia de la formación del complejo se ha verificado por medidas de la rotación óptica [1970 JCS 877].

II.B.3.3.5 NATURALEZA DE LAS FUERZAS DE ENLACE EN LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

La naturaleza y características de las fuerzas de unión que están implicadas en la formación de los complejos de inclusión está sujeta a ciertas controversias. Por ello, no puede hablarse en términos generales de un enlace o interacción de tipo apolar, tal y como se entiende para los que se establecen en la formación de los complejos enzima-sustrato, ya que estas uniones "apolares" se caracterizan por un cambio favorable en la entropía [1959 APC 1] [1959 CB 1739] [1963 ARB 269]. Sin embargo, la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas va acompañada por un cambio favorable en el valor de la entalpía y generalmente desfavorable en el de la entropía. Para explicar este cambio

considerable de la entalpía se argumentan diversas razones [1973 AIC 209] [1977 L IL], entre las que se incluyen las siguientes:

- A. Interacciones de tipo Van der Waals entre la molécula huésped y la ciclodextrina [1956 AgC 115] [1966 RS 733] [1967 JACS 3242] [1977 JACS 5146].
- B. Formación de puentes de hidrógeno entre la molécula huésped y los grupos hidroxilo de la ciclodextrina [1955 RPAC 143] [1956 RTCPB 891] [1958 CI 892] [1959 CB 1739] [1965 JACS 1115] [1971 RTCPB 680] [1979 JPC 1805].
- C. Pérdida de energía debida a las moléculas de agua alojadas en el interior de la cavidad de la ciclodextrina [1967 JACS 3242].
- D. Relajación de la energía de tensión del anillo de la macromolécula de ciclodextrina [1972 N 392] [1974 ACIEE 156] [1974 JACS 3630] [1976 JACS 3357].

Algunos autores [1981 JACS 1750] [1984 T 545] consideran que en la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas, también se hallan implicadas de manera circunstancial interacciones polares, de tal manera que el cambio en la energía libre total del sistema podría resumirse, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{total}} = \Delta G_{\text{Van der Waals}} + \Delta G_{\text{puentes de hidrógeno}} + \Delta G_{\text{pérdida de agua}} + \Delta G_{\text{tensión del anillo}} + \Delta G_{\text{polar}}$$

Los estudios sobre la naturaleza de estos enlaces con moléculas huésped seleccionadas, han puesto de manifiesto la importancia de cada una de las fuerzas implicadas en el proceso de inclusión [1978 JACS 916]. La comparación de la magnitud de cada una de las fuerzas implicadas demuestra que para un huésped apolar, las interacciones mencionadas en los apartados A, C y D, son las más significativas. En cualquier caso, la importancia de cada una de las fuerzas depende de las características de la molécula huésped así como de la ciclodextrina, ya que además de fuerzas de enlace parece ser que la pérdida de la estructura del agua alrededor de la molécula huésped (apolar), proceso íntimamente relacionado con las interacciones apolares o hidrofóbicas, así como la restricción en la libertad de movimiento de la molécula huésped en solución, ejercen en conjunto una cierta influencia en la formación del complejo de inclusión.

Las interacciones por fuerzas de Van der Waals incluyen las fuerzas de dispersión de London, las interacciones dipolo-dipolo y las interacciones dipolo-dipolo inducido. En algunos casos suele hacerse la distinción entre interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y carga-carga de las fuerzas de dispersión de London, especialmente si se trata de valorar la importancia relativa de estas interacciones "polares".

Las interacciones entre los dipolos permanentes de las moléculas huésped y los dipolos permanentes de las moléculas inclusoras carecen de importancia, puesto que las moléculas huésped sin dipolos permanentes forman complejos estables con las ciclodextrinas. La fuerza relativa de las interacciones dipolo permanente-dipolo inducido [1959 QRCS 183] y la intensidad de las fuerzas de dispersión de London [1930 ZP 245] son proporcionales al recíproco de la sexta potencia de la distancia entre las dos moléculas y a sus polarizabilidades. De esta forma, la magnitud de estas interacciones es elevada en el caso de los complejos de inclusión, ya que el diámetro interno de la cavidad de las ciclodextrinas (4'5 Å para la α -CD y 7'0 Å para la β -CD) hace que la distancia entre la molécula huésped y la pared de la ciclodextrina sea la adecuada para que se establezcan estas interacciones. Así, se observa una relación lineal entre el logaritmo de las constantes de disociación de los complejos ciclodextrina-sustrato y la refracción molar del sustrato, para una serie de fenilacetatos sustituidos. Este hecho es indicativo del papel que desempeñan las fuerzas de Van der Waals, puesto que la refracción molar del sustrato está relacionada con la polarizabilidad [1967 JACS 3242].

Análogamente, en un estudio sobre la complejación con ciclodextrinas con distintos derivados sustituidos del ácido *p*-benzoico, se pone de manifiesto que existe una relación entre las constantes de disociación y las constantes de Hammett para los distintos sustituyentes, parámetros también relacionados con la polarizabilidad [1966 RS 733]. En consecuencia, las fuerzas de Van der Waals juegan un papel importante en la formación de los complejos de inclusión con ciclodextrinas, como se ha puesto de manifiesto en numerosos ejemplos [1969 JACS 4035] [1976 JPSPC 2009].

Los puentes de hidrógeno constituyen otra de las fuerzas conductoras en la formación de los complejos de inclusión con ciclodextrinas. Matsui [1970 BCSJ 1909] demostró la formación de un complejo de inclusión estable de forma muy sencilla en el caso del hidroperóxido de *terc*-butilo, que es capaz de formar puentes de hidrógeno de

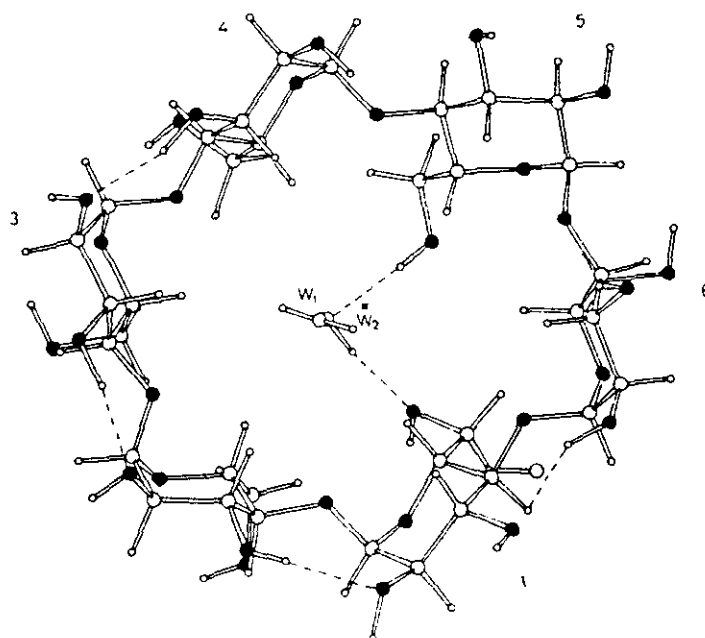


FIGURA 25: Estructura de la α -CD mostrando como dos moléculas de agua, W_1 y W_2 están incluidas en el interior de la cavidad. Los números corresponden a las unidades de glucosa

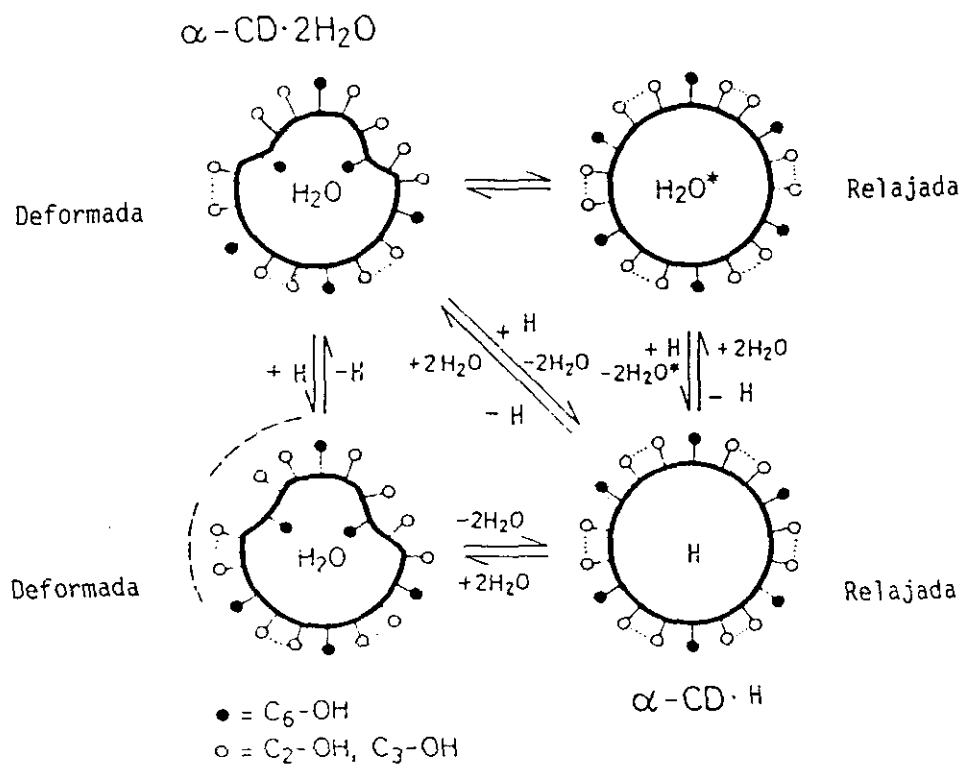


FIGURA 26: Procesos en la formación de un complejo de inclusión con α -CD

forma más favorable que el *terc*-butil alcohol, si bien para este compuesto se ha descrito la formación de complejos ternarios muy estables [1986 JPC 1963] [1991 JACS 1573].

El agua es un factor crucial en la formación del complejo. Nos referimos a las moléculas de agua alojadas en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. La estructura del agua en el interior de la cavidad no es la misma que en el exterior ya, que la cavidad es apolar y su tamaño es restringido [1974 JMB 77]. En solución acuosa son varias las moléculas que se alojan en el interior de la cavidad, dependiendo de la ciclodextrina. Bender [1973 AIC 209] sugiere que las moléculas de agua del interior de la cavidad tienen una entalpía elevada; por tanto la formación del complejo de inclusión implica el desplazamiento de las moléculas de agua de elevada entalpía por la molécula huésped, proceso que implica un cambio favorable de la entalpía. La existencia de estas moléculas de agua en el interior de la cavidad se ha puesto de manifiesto mediante estudios cristalográficos [1975 BCSJ 2409] [1976 BioC 187] [1978 AgC 738] [1982 JOC 1143]. Por otra parte, la pérdida de las moléculas de agua se acompaña además de los siguientes cambios que contribuyen igualmente a la variación de la energía:

- Desaparición de los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y la ciclodextrina, así como de las interacciones de Van der Waals.
- Formación de enlaces de hidrógeno, así como establecimiento de enlaces por fuerzas de Van der Waals entre las moléculas de agua salientes y las moléculas de agua de la fase acuosa.
- Libertad de movimiento de las moléculas de agua liberadas de la cavidad.

Las moléculas de agua que se sitúan alrededor de un huésped apolar están enlazadas más fuertemente que aquellas que componen la fase acuosa externa y en consecuencia, para las primeras, el libre movimiento está impedido. De ello se deduce que la pérdida de la estructura del agua debería ser un proceso termodinámico que se acompañase de un incremento tanto en la entalpía como en la entropía.

Experimentalmente se comprueba que si bien puede conseguirse la formación de complejos de inclusión en otros solventes no acuosos, la presencia de agua favorece sin

embargo la formación del complejo. Consecuentemente no se observa la formación de complejo entre el ácido benzoico y las ciclodextrinas cuando se emplean como solventes cloroformo, tetracloruro de carbono, éter, dioxano y benceno [1964 JPS 69]. En dimetilsulfóxido, donde si se logra la formación de complejo, las constantes de disociación son mucho mayores que en agua. Así por ejemplo, las constantes de disociación para el complejo anisol/ β -CD son 400 mM en DMSO y 5 mM en agua [1975 JACS 6869], lo cual demuestra la importancia del medio acuoso en la formación del complejo.

Saenger y col. [1972 N 392] [1974 ACIEE 552] [1974 JACS 3630] [1976 JACS 3357] sostienen que la relajación de la tensión del anillo de ciclodextrina que tiene lugar cuando se produce el fenómeno de inclusión, es otro de los factores que interviene como fuerza conductora en el proceso, según se desprende de distintos estudios cristalográficos realizados mediante técnicas de rayos-X y mediante cálculos teóricos. La conformación y la energía potencial del macrociclo de α -CD en solución acuosa (suponiendo que la conformación es idéntica a la de la α -CD hexahidratada) y antes de la formación del complejo de inclusión es menos simétrica y de mayor energía que las conformaciones correspondientes a los complejos de inclusión de α -CD con yodo, 1-propanol, metanol o acetato potásico.

Bergeron y col. [1976 BioC 197] [1977 JACS 5146] evaluaron la contribución de la relajación de la energía de tensión del anillo y de la pérdida de las moléculas de agua de la cavidad en la formación de los complejos de inclusión. En muchos casos, la formación de puentes de hidrógeno es de gran importancia. Es posible suponer que si la energía de tensión del anillo es una de las principales fuerzas conductoras para la inclusión, la metilación de los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas debería afectar claramente a los valores de las constantes de disociación de los complejos; pero esto no sucede de acuerdo con lo previsto. Por tanto, aunque las ciclodextrinas metiladas presenten ventajas considerables desde el punto de vista de la solubilidad [1982 CPB 1796] [1986 BCSJ 643], no siempre se produce una mejora en la formación de los complejos de inclusión. En consecuencia puede afirmarse que la relajación de la tensión del anillo no es la principal fuerza en la formación del complejo de inclusión. En el caso de las ciclodextrinas modificadas, se sabe que la capacidad de inclusión de la dimetil- β -CD es en general mayor que la de la trimetil- β -CD [1984 JIP 597] [1985 PI 61] y este comportamiento obedece más a variaciones en la solubilidad que en la tensión del anillo [1976 BioC 197].

Harata [1976 BCSJ 2066] ha llevado a cabo estudios en los que intenta profundizar en la magnitud de la contribución de las distintas fuerzas y energías que participan en la formación de los complejos de inclusión en el caso del benceno sulfonato sódico. Considera y evalúa las interacciones por fuerzas electrostáticas y de Van der Waals, y la diferencia entre la energía de solvatación del complejo y la suma de las energías de solvatación de los dos componentes del complejo, proponiendo dos posibles estructuras para el complejo. En una de ellas, el resto aromático (benceno) apolar se incluye en la cavidad de la ciclodextrina. Esta es la estructura más estable. En la otra, el resto sulfonato (polar) es el que se incluye en la cavidad de la ciclodextrina. En el primer caso, la energía total de interacción es de $-23'78$ kcal/mol, mientras que en el segundo es de $-15'04$ kcal/mol. Por tanto, el complejo energéticamente más favorecido es el primero. Además, a partir de los cálculos parciales de las energías de interacción (electrostática, Van der Waals, solvatación), se deduce que el cambio en la energía de solvatación es el más importante, las interacciones de Van der Waals tienen una importancia notable, mientras que la contribución debida a las interacciones electrostáticas es prácticamente despreciable. Sin embargo, aunque plausibles, estos cálculos no pueden ser dados por buenos ya que no tienen en cuenta las entalpías del agua dentro y fuera de la cavidad, ni la tensión debida al anillo de ciclodextrina.

Tabushi y col. han realizado un estudio similar para el caso del complejo naranja de metilo/ α -CD [1978 L XLVIII]. La energía de estabilización por fuerzas de Van der Waals es mayor en el caso de la α -CD que en el de la α -CD hidratada. La energía conformacional es mayor en el caso de la α -CD que en el de la α -CD hexahidratada. Estos resultados se contraponen a los obtenidos por Saenger, para el cual como ya se ha expuesto, la energía conformacional es la principal fuerza conductora.

El estudio de los cambios energéticos (entalpía y entropía) en la formación de un complejo 1-adamantano-carboxílico/ α -CD, pone de manifiesto la importancia de las fuerzas apolares de enlace "clásicas". El resto de adamantano es demasiado voluminoso para incluirse en la α -CD (si puede hacerlo en la β -CD [1989 JACS 6765]), por lo cual es probable que se sitúe en la parte superior de la cavidad. La formación de este complejo transcurre con un cambio bastante favorable de entropía ($\Delta S = +10$ u.e.) y un pequeño cambio favorable de entalpía ($\Delta H = -1'2$ kcal/mol). Por tanto más del 70% de la energía para la estabilización del complejo proviene del cambio entrópico, el cual está directamente

relacionado con la transferencia del sustrato del medio acuoso a un medio más apolar (la cavidad de la ciclodextrina). La formación de un complejo entre el 1-adamantano carboxílico y la β -CD, cuya cavidad puede alojar a un sustrato tan voluminoso, va acompañado de un cambio muy favorable en la entalpía ($\Delta H = -4.7$ kcal/mol) y de un pequeño cambio desfavorable en la entropía ($\Delta S = -1$ u.e.). Por tanto, la estabilización en este caso se produce gracias a los enlaces por fuerzas apolares.

En resumen, de todo lo expuesto se deduce que son una serie de factores, entre los que se encuentran las fuerzas de Van der Waals, los puentes de hidrógeno, la relajación de la energía debido a las moléculas de agua y a la tensión del anillo de la ciclodextrina, los que favorecen la formación del complejo, si bien la contribución de cada uno de ellos es variable y depende de cada sustrato. Estos dos últimos factores están íntimamente relacionados con las fuerzas de unión apolares y el mecanismo "llave-cerradura" que caracteriza las reacciones enzimáticas siendo la base del reconocimiento molecular.

II.B.3.3.6 FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN CON CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas forman complejos de inclusión con numerosos compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, siempre que el compuesto que se vaya a incluir tenga un tamaño compatible con las dimensiones de la cavidad de la ciclodextrina [1967 Nw 625]. Además, la formación del complejo se ve favorecida por las características de polaridad de la molécula huésped, aunque son muchos los autores que piensan que los factores decisivos en la formación del complejo son más bien geométricos que químicos [1963 JPS 132]. Puede afirmarse que el proceso de inclusión transcurre gracias a la interacción energéticamente favorable entre las moléculas huéspedes, relativamente apolares, y la cavidad hidrofóbica imperfectamente solvatada de las ciclodextrinas.

Para que se forme el complejo de inclusión ha de producirse una interacción entre la molécula huésped y la ciclodextrina, que generalmente se califica como "interacción hidrofóbica", dada la naturaleza de las fuerzas que conducen a la formación del complejo y que se han comentado en el apartado 2.3.3.5. Estas interacciones hidrofóbicas son relativamente débiles, ya que las fuerzas implicadas en la formación de los complejos son

fuerzas de tipo Van der Waals e interacciones dipolo-dipolo. Así, si se compara la energía necesaria para la formación de un enlace covalente (10^2 kcal/mol) con la necesaria para establecer un enlace por puentes de hidrógeno (10 kcal/mol) y la imprescindible para las interacciones por fuerzas de Van der Waals (1 kcal/mol), se deduce que estas interacciones son las más débiles y en muchos casos no permiten la formación de un complejo estable.

Sin embargo, si la molécula adopta o posee una disposición espacial específica, cuyo radio de Van der Waals sea compatible con el tamaño de la cavidad de la ciclodextrina, pueden establecerse estas "interacciones hidrofóbicas" y las especies se incluyen dando lugar a un complejo cuya estabilidad puede ser en muchos casos semejante a la que resultaría de una unión covalente. Los complejos más estables se forman en el caso de moléculas hidrofóbicas con sustratos que no son capaces de formar enlaces por puentes de hidrógeno, por ejemplo benceno. La estabilidad del complejo es proporcional al carácter hidrofóbico de los sustituyentes sobre la molécula base. Así, los sustituyentes metilo o etilo incrementan la estabilidad de los complejos mientras que los hidroxilos la disminuyen al igual que los grupos ionizables ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$). Casu y Rava [1966 RS 733] observaron que la presencia de sustituyentes electrodonadores favorece la estabilidad de los complejos.

Si en una molécula se dan todas estas características geométricas, químicas, estéricas y energéticas favorables para la inclusión, entonces se iniciará el proceso de formación del complejo, cuyos pasos se representan de forma esquemática en la FIGURA 26.

- Las moléculas huésped se desplazan y reemplazan directamente a las moléculas de agua ya incluidas en el interior de la ciclodextrina.
- La ciclodextrina absorbe energía y adopta la conformación hexagonal de "baja energía". Al mismo tiempo las moléculas de agua incluidas se orientan de forma desordenada, lo cual da lugar a que la ciclodextrina, con las moléculas de agua en su interior adopte una conformación relajada. Esta conformación sólo se adopta en presencia de moléculas huésped que se pueden incluir, en cuyo caso, las moléculas de agua del interior son sustituidas fácilmente por aquellas.

- Las moléculas de sustrato y las de ciclodextrina forman un "intermedio" quedando retenidas las moléculas de sustrato en la superficie para penetrar después en el interior de la cavidad, lo cual sólo tiene lugar después de un proceso de absorción de la energía de activación.

La formación del complejo de inclusión implica por tanto la modificación de la conformación de la ciclodextrina, en un mecanismo de "ajuste inducido" semejante al de las reacciones enzimáticas [1976 BioC 187]. De todo lo expuesto, se desprende que el ajuste de la molécula de sustrato a la cavidad de la ciclodextrina es un proceso decisivo y en cierta medida independiente del carácter de la molécula huésped [1978 JCSPT 760]. Sin embargo, esta independencia es relativa debido a que para la formación del complejo es necesaria la deshidratación total o parcial del sustrato, seguida de la rehidratación que se produce tras el proceso de incorporación, siendo estos procesos característicos de los sustratos.

Para otros autores [1967 JACS 14], el mecanismo de formación de los complejos de inclusión puede dividirse en los siguientes pasos:

1. Aproximación de las moléculas de sustrato a las moléculas de ciclodextrina.
2. Ruptura de la estructura del agua del interior de las moléculas de ciclodextrina y salida al exterior de algunas moléculas de agua.
3. Ruptura de la estructura de las moléculas de agua que rodean a la molécula de sustrato, seguida de la inclusión en la cavidad de la ciclodextrina y transporte de algunas moléculas de agua a la solución.
4. Interacción entre los sustituyentes de la molécula de sustrato y la cavidad interna de la ciclodextrina.
5. Formación de puentes de hidrógeno entre la molécula huésped y los grupos -OH de la ciclodextrina. Este paso es extremadamente rápido y por tanto no es determinante para el proceso de inclusión [1965 JMB 64].

6. Reconstitución de la estructura del agua alrededor del complejo.

En los pasos 1,4 y 5 se hallan implicados factores estéricos y por tanto la estabilización del complejo depende de la geometría de la molécula de sustrato; dicho de otra manera, el impedimento estérico puede impedir la formación del complejo. Los pasos 2,3 y 6 son dependientes de la organización de las moléculas de agua y por tanto de las características químicas de la molécula que se quiere incluir.

II.B.3.3.7 METODOS PARA LA DETECCION DE LA FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION CON CICLODEXTRINAS

II.B.3.3.7.1 INTRODUCCION

La capacidad de formar complejos de inclusión, ya sea en estado sólido o en solución, es la principal característica de las ciclodextrinas. La inclusión tiene lugar gracias a que las moléculas huéspedes quedan embebidas en el interior de la cavidad, siendo estable el aducto formado, ya sea en medios líquidos o sólidos, gracias a la estructura anular característica de las ciclodextrinas. Esta estructura distingue a las ciclodextrinas de otras moléculas, que requieren la cristalización del complejo para poder comprobar (mediante rayos-X u otras técnicas analíticas) que el tamaño de la cavidad es el adecuado para la inclusión [1975 JPS 1585] [1954 L XXXVI].

La formación de complejos de inclusión puede detectarse de modos muy diversos gracias a las modificaciones que se producen en las propiedades de la molécula huésped. Estas modificaciones pueden ser físicas (solubilidad, tensión superficial), químicas (reactividad, variaciones en el valor de las constantes de ionización ácido-base) o espectroscópicas, como modificaciones de los parámetros espectrales, tanto cualitativos (posición de los máximos, desplazamiento químico) como cuantitativos (variaciones en el coeficiente de absorción molar o en la intensidad de fluorescencia). Estas variaciones espectrales son similares a las observadas cuando las moléculas huéspedes se transfieren de solventes de mayor a menor polaridad. Los métodos espectroscópicos son los más adecuados para la detección de estos complejos, teniendo en cuenta que la naturaleza de las fuerzas implicadas en su formación puede calificarse de "débil". Estas interacciones no covalentes, semejantes a las variaciones de la polaridad del solvente, son por tanto

detectables de forma fiable mediante métodos espectroscópicos [1985 ACA 95] [1988 ACA 129].

II.B.3.3.7.2 METODOS DE DETECCION DE COMPLEJOS SOLIDOS

Existen diversas técnicas instrumentales para la detección de los complejos formados, ya sea en estado sólido, ya sea en solución acuosa. Teniendo en cuenta que esta memoria se centra en el estudio de complejos en solución, nos detendremos muy brevemente en este apartado.

II.B.3.3.7.2.1 DIFRACTOMETRIA DE RAYOS-X

Constituye la metodología más apropiada para realizar el análisis de la estructura cristalina del complejo [1984 L L]. Estas técnicas no son útiles en análisis de rutina debido a las dificultades que suele entrañar la preparación de la muestra y a la infraestructura necesaria para realizar los análisis. No obstante, los diagramas de difracción son una prueba concluyente para demostrar la inclusión, ya que el difractograma del complejo es diferente de la superposición de los difractogramas de las moléculas huéspedes y de las ciclodextrinas aisladas. Además, en el caso de tratarse de moléculas huéspedes líquidas, como por ejemplo ácidos grasos, constituye un método muy adecuado para poner de manifiesto la existencia del complejo, permitiendo elucidar el tipo de estructura cristalina del mismo.

II.B.3.3.7.2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

La espectroscopia de RMN de ^{13}C aplicada a sólidos, es una técnica espectroscópica valiosa, que permite el estudio de las propiedades dinámicas de los complejos de inclusión en estado sólido [1982 JCSCC 1386], a diferencia de la difracción de rayos-X que suministra información de las propiedades estáticas. Las variaciones en el valor del desplazamiento químico para los átomos C_1 y C_4 de la ciclodextrina se relacionan con los cambios conformacionales que se producen debido a la inclusión [1985 CaR 12].

II.B.3.3.7.2.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION INFRARROJA

En el espectro de absorción IR, se pueden apreciar desplazamientos de aproximadamente 40 cm^{-1} en las bandas de absorción de las moléculas huéspedes tras la formación del complejo de inclusión. Así por ejemplo, las bandas de tensión correspondientes a la absorción del carbonilo y a los -OH, se desplazan debido a que en la inclusión se rompen los puentes de hidrógeno intermoleculares y las moléculas quedan aisladas en el interior de la cavidad. Estos hechos se han demostrado para el ácido benzoico y el ácido salicílico [1978 CPB 3419] [1980 CPB 1552]. No obstante, la espectroscopia IR no constituye una prueba concluyente en sí misma ya que muchas de las alteraciones espectrales quedan enmascaradas por el espectro de absorción IR de las ciclodextrinas.

II.B.3.3.7.2.4 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Esta técnica es complementaria del IR y la información que aporta es semejante. Las bandas se desplazan y se modifican como consecuencia del proceso de inclusión. Así pues, la tensión fuera del plano correspondiente al agrupamiento C-H que aparece a 801 cm^{-1} , incrementa su intensidad de forma apreciable tras la formación del complejo entre la tolbutamida y la β -CD [1981 CPB 2710]. Probablemente, la espectroscopia Raman resulta de mayor utilidad en el caso de complejos en medios líquidos, donde la presencia de soluciones acuosas no supone un obstáculo como ocurre en el caso de la espectroscopia IR.

II.B.3.3.7.2.5 METODOS TERMICOS

Las distintas técnicas que se engloban bajo el nombre de métodos térmicos son muy apropiadas para la investigación de complejos de inclusión en estado sólido, o bien de complejos formados en medios líquidos pero aislados y cristalizados para hacer posible su estudio. Los métodos térmicos más utilizados son: el estudio por **calorimetría diferencial de barrido** (DSC), por **análisis térmico diferencial** (DTA), por **termogravimetría** (TG) y por **termogravimetría diferencial** (DTG).

Cuando se produce la inclusión, el punto de fusión o ebullición de las moléculas huéspedes se desplaza a temperaturas más elevadas, pudiendo desaparecer o bien quedar enmascarado en torno a la temperatura de descomposición de las ciclodextrinas ($\approx 300^{\circ}\text{C}$). Este desplazamiento implica una mejora en las características de estabilidad de numerosos principios activos, especialmente en el caso de aceites y líquidos volátiles [1979 JJA 103].

Se han estudiado por ejemplo, distintos derivados de ácido cinámico, los cuales forman complejos estables con α - y β -CD, observándose que el grado de volatilidad de los complejos varía con los sustituyentes (metilcinamato, etilcinamato, cinamaldehído) [1979 CPB 76]. Las mezclas físicas presentan una endoterma aparente a 150°C debido a las pérdidas por ebullición. En el complejo, esta endoterma desaparece completamente y sólo se observa la correspondiente a la descomposición de la ciclodextrina, que se sitúa a 290°C . Además de un descenso en la volatilidad, la formación del complejo mejora la estabilidad ya que disminuye la fotodegradación y facilita la solubilidad. En los complejos con benzaldehído se han obtenido resultados muy similares [1983 IJP 253] con α - y β -CD.

En la FIGURA 27 se presenta un estudio similar, donde se pueden observar los diagramas obtenidos mediante análisis térmico diferencial y termogravimetría, que confirman la reducción en la volatilidad para los complejos de clofibrato con β - y γ -CD [1983 PAH 338]. Se han obtenido resultados similares para diversos fármacos tales como: diazepam/ γ -CD [1983 IJP 327], fenoxetina/ β -CD [1984 IJP 51], prostaglandina $F_{2\alpha}$ / γ -CD [1984 JPS 382], prednisolona/ β -CD y γ -CD [1985 PAH 117] e ibuprofeno/ β -CD [1986 IJP 95]. En general se puede afirmar que la desaparición de las endotermas de fusión características del compuesto incluido, es más efectiva a medida que se incrementa la cristalinidad del complejo, hecho que se puede comprobar mediante difracción de rayos-X [1989 IJP 175].

II.B.3.3.7.3

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE COMPLEJOS EN SOLUCIÓN

Cramer y col. [1967 JACS 14] estudiaron la cinética de formación de un complejo de inclusión en solución acuosa entre α -CD y *p*-nitrofenol. Los resultados obtenidos les permitieron afirmar que la difusión de las moléculas es el paso que condiciona

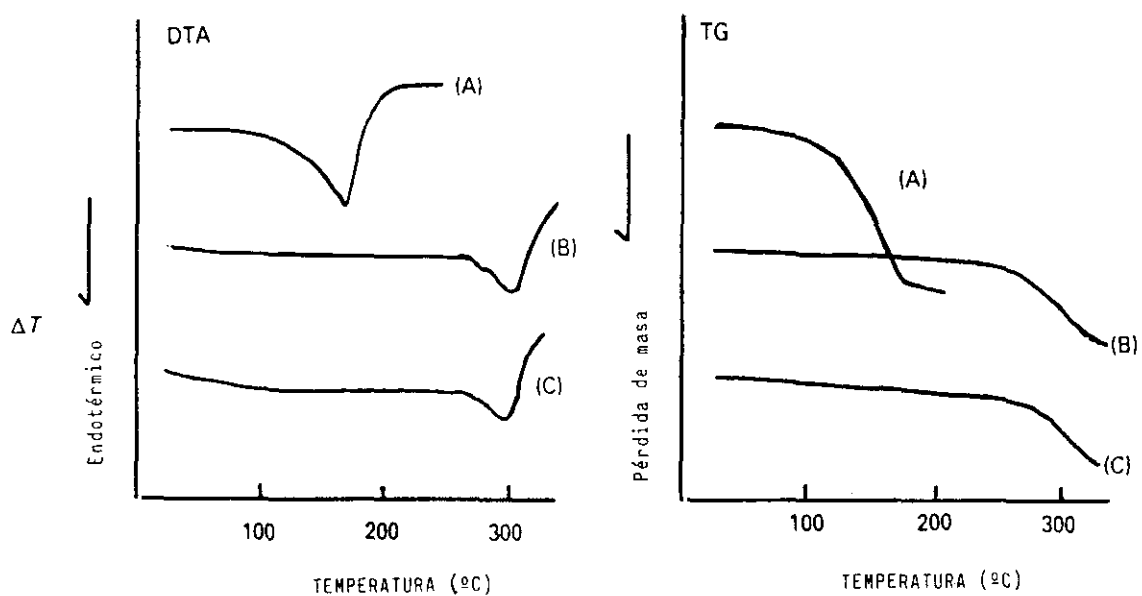


FIGURA 27: Curvas de análisis térmico diferencial (DTA) y de termogravimetría de: (A) clofibrato, (B) complejo de inclusión clofibrato/ β -CD y (C) complejo de inclusión clofibrato/ γ -CD.

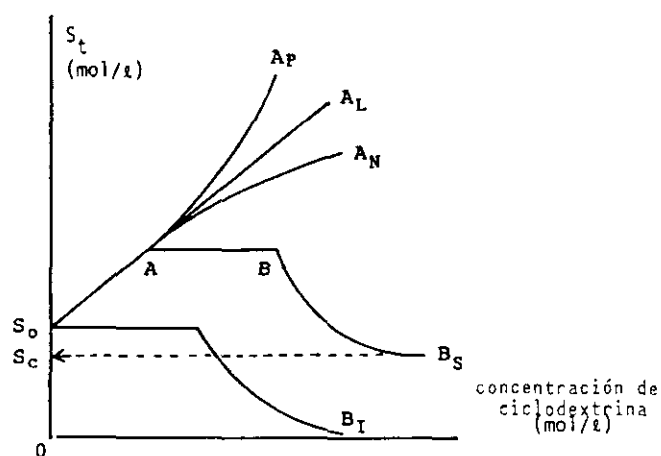


FIGURA 28: Diagrama de solubilidad de fases. A: comportamiento de un complejo de inclusión soluble, B: comportamiento de un complejo de inclusión de solubilidad definida (L: lineal, P: positivo, N: negativo, I: insoluble, S: soluble, S_t : solubilidad aparente, S_c : solubilidad intrínseca).

prácticamente en su totalidad la formación del complejo. Estos pasos pueden seguirse por distintas técnicas analíticas que permiten estudiar las modificaciones físicas y químicas que se producen en las moléculas huéspedes.

La mayoría de los métodos permiten la caracterización del complejo mediante el cálculo de su estequiometría y sus constantes de asociación. En general puede hablarse de estequiometría 1:1 para la mayoría de los complejos con ciclodextrinas. Sin embargo, si la molécula huésped es demasiado grande para el tamaño de la cavidad, pueden producirse asociaciones de dos moléculas de ciclodextrina por cada molécula huésped. Si por el contrario la cavidad es lo suficientemente grande como para alojar a dos moléculas huésped, la estequiometría anteriormente citada se invierte. El cálculo de la constante de asociación que define la estabilidad del complejo puede llevarse a cabo en virtud de la variación de alguna de las propiedades físicas o químicas de la molécula huésped al producirse la inclusión. Esta variación puede relacionarse con la concentración de ciclodextrina, lo que permite el cálculo de la constante de estabilidad.

Dado que cada metodología da lugar a un desarrollo para el cálculo del valor de K_a , no nos vamos a detener a considerar pormenorizadamente el cálculo de esta constante, aunque lo haremos más adelante al explicar concretamente la metodología por nosotros elegida, al igual que haremos en la determinación de la estequiometría. Comenzaremos por describir las metodologías basadas en la variación de las propiedades físicas y químicas para posteriormente describir los cambios en las propiedades espectroscópicas.

La variación en los tiempos de retención en cromatografía puede considerarse una consecuencia de la modificación de la solubilidad de las moléculas huésped, debido al proceso de inclusión. Sin embargo, puesto que las técnicas instrumentales adecuadas se consideran en apartados posteriores, la cromatografía líquida no se trata en el apartado de la variación de la solubilidad, si bien podría hacerse de este modo.

II.B.3.3.7.3.1 METODOS DE VARIACION DE LA SOLUBILIDAD

Debido a que las moléculas quedan "envueltas" por las ciclodextrinas que son hidrosolubles, se puede observar un incremento notable en la solubilidad de compuestos débilmente hidrosolubles. Aunque por regla general el complejo es menos hidrosoluble que

la ciclodextrina sólo, la solubilidad en agua de las moléculas hidrófobas se ve siempre notablemente mejorada y puede incrementarse entre un 10% en el peor de casos hasta un 300% para los complejos más hidrosolubles [1961 JACS 2312] [1964 JPS 924]. Cohen y Lach [1963 JPS 132] observaron que la solubilidad del compuesto generalmente se incrementa con la concentración de ciclodextrina, poniendo de manifiesto este hecho para diecinueve fármacos débilmente solubles en agua. Las moléculas más voluminosas y que se ajustan peor a la cavidad se solubilizan con mayor dificultad. Igualmente se pone de manifiesto que la mejora en la solubilidad es mayor en el caso de la β -CD que en el de la α -CD. Si se representa la concentración de analito frente a la concentración de ciclodextrina se pueden obtener representaciones lineales, pudiendo definirse la pendiente como:

$$\text{Pendiente} = \frac{\text{incremento en la solubilidad (M)}}{\text{concentración de ciclodextrina (M)}}$$

Cuanto mayor sea la pendiente, mayor es la mejora en la solubilidad. Normalmente las moléculas más pequeñas se incluyen mejor y muestran mejoras más apreciables en la solubilidad lo que se manifiesta por pendientes mayores. Se ha encontrado una correlación entre la solubilidad y los sustituyentes, para los complejos de inclusión de los ácidos carboxílicos y sus fenil derivados con β -CD [1965 JPS 1745] [1975 CPB 1205].

Así, si se adicionan distintas cantidades de molécula huésped a soluciones de ciclodextrina de distintas concentraciones y se agita a temperatura constante hasta alcanzar el equilibrio, se pueden monitorizar las concentraciones de molécula huésped solubilizada, esto es, los cambios en la solubilidad según la concentración de ciclodextrina, lo cual constituye un diagrama de solubilidad de fase, tal y como se puede apreciar en la FIGURA 28. Los diagramas de solubilidad se pueden agrupar en dos tipos. Los que presentan un perfil de tipo "A" en los cuales se forma un complejo de inclusión soluble, y los que presentan un perfil de tipo "B", en los que se forma un complejo de solubilidad definida [1965 AACI 117].

Las variaciones en la solubilidad han permitido el cálculo de las constantes de asociación de los complejos formados entre distintos barbitúricos con β -CD [1971 JPS 652]. Igualmente permiten poner de manifiesto la interacción entre la β -CD y la espironolactona [1989 CaR 313].

La 1,8-dihidroxiantraquinona forma complejos con α -, β - y γ -CD. Los diagramas de solubilidad de fase ponen de manifiesto que en el caso de la β -CD, la solubilidad se incrementa de forma lineal con la concentración de ciclodextrina, hasta alcanzar el valor de la concentración de saturación con una constante de formación de 330 M^{-1} . La γ -CD es más eficaz en la formación del complejo, con un valor de $K = 500 \text{ M}^{-1}$ que se calcula a partir del diagrama de solubilidad [1988 JPS 523].

Connors y Pendergast [1984 JACS 7607] relacionan la estabilidad de los complejos obtenidos entre distintos derivados de benceno 1,4-disustituídos y α -CD, con la solubilidad de los sustratos, el momento dipolar, los coeficientes de partición y el calor de fusión. Las constantes de asociación, calculadas a partir de los datos de solubilidad, pueden relacionarse asimismo con parámetros electrónicos tales como la constante σ -Hammet.

El incremento en la solubilidad, para distintos derivados de la estructura del bimano [1989 AL 1567] tras la formación de un complejo con β -CD, puede relacionarse con el aumento en el valor de la absorbancia y de la fluorescencia de estos compuestos, gracias a la protección que aporta la formación del aducto.

II.B.3.3.7.3.2 METODOS DE DIFUSION

La formación de complejos con ciclodextrinas puede verificarse claramente mediante el empleo de una membrana de diálisis semipermeable, que permita la difusión selectiva a uno y otro lado de dicha membrana. De este modo puede verse que si se coloca una solución de β -CD en un lado de la membrana y una sustancia capaz de incluirse en su interior en el otro, cabría esperar que al cabo de un tiempo se alcance a ambos lados de la membrana un equilibrio de concentraciones de ambos compuestos, β -CD y sustrato, gracias al proceso de difusión. Sin embargo, lo que se observa es un incremento notable en la concentración de sustrato en el lado donde se encuentra la solución de ciclodextrina,

indicando la formación del complejo [1982 L XXXIVa] ya que el equilibrio de difusión es más favorable al paso de la molécula que tiende a incluirse en la cavidad de la β -CD.

II.B.3.3.7.3.3 METODOS CINETICOS

Como se comentará más adelante, las ciclodextrinas aceleran determinadas reacciones gracias a un efecto catalítico [1980 JACS 762] aunque a veces pueden hacer que se produzcan más lentamente, al proteger a los sustratos de especies reactivas externas [1982 JPP 627] tales como el oxígeno [1983 IJP 253] y la luz ambiental [1978 CL 1109], debido a la formación de complejos de inclusión. En resumen, podría decirse que modifican la constante de velocidad de reacción.

Si representamos el proceso de inclusión y de reacción de acuerdo con el siguiente esquema:



El incremento o el descenso de la velocidad de reacción, será indicativo de la formación del complejo de inclusión. Aplicando una metodología análoga a la de la cinética de Michaelis-Menten, puede asimismo calcularse la constante de formación del complejo K_a . Este valor puede determinarse igualmente mediante las representaciones gráficas de Lineweaver-Burk [1934 JACS 658], Colter [1963 JACS 114] y Eadie [1942 JBC 85]. Los métodos cinéticos tienen la ventaja de que permiten el cálculo de las constantes de formación del complejo en el caso de moléculas químicamente lábiles y a las que no puede aplicarse otras metodologías [1978 CL 327] [1979 CPB 435]. Igualmente se ha puesto de manifiesto su utilidad en el cálculo de las constantes de equilibrio de los complejos de α -CD con aniones inorgánicos [1977 JPC 944].

II.B.3.3.7.3.4 METODOS INSTRUMENTALES

Con el rápido y creciente desarrollo que las técnicas instrumentales han experimentado en los últimos años, constituyen la metodología más utilizada para la

detección de complejos de inclusión así como en el cálculo de las constantes de asociación de los mismos, abarcando desde las más versátiles y más utilizadas, como la espectroscopia de absorción UV-VIS, hasta las más sofisticadas como la de resonancia magnética nuclear.

II.B.3.3.7.3.4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION UV-VIS

Constituye junto con el dicroísmo circular (DC), una de las técnicas instrumentales más utilizadas en la detección de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Su utilidad reside en el hecho de que es una técnica versátil, de muy sencillo manejo, al tiempo que precisa, por lo que proporciona datos de gran fiabilidad en el cálculo de las constantes de asociación de complejos con ciclodextrina. Por otra parte, hemos de tener en cuenta que es de amplia aplicación ya que la mayoría de las moléculas orgánicas absorben en la región UV o visible del espectro electromagnético, experimentando variaciones en las posiciones de los máximos de absorción (cualitativas) o en el valor del coeficiente de absorción molar (cuantitativas), con una considerable mejora en la absorbancia [1989 AL 1567] tras la formación del complejo con las ciclodextrinas. Asimismo, ha de considerarse que numerosas moléculas orgánicas son débilmente solubles en agua, por lo cual, al no dar lugar a soluciones homogéneas, son difícilmente analizables por esta espectrofotometría. Sin embargo, la inclusión conlleva la solubilización, lo cual permite obtener el espectro de absorción en solución acuosa, pudiéndose producir variaciones en su espectro comparables a las que se observarían al disolver la molécula en solventes de baja polaridad, con respecto a otros solventes más polares.

Los desplazamientos de los máximos de absorción, como consecuencia de la formación del complejo son semejantes a los observados al transferir la molécula de un solvente de mayor polaridad a otro de menor polaridad y pueden explicarse por la protección parcial que proporciona la cavidad de la ciclodextrina a los electrones excitables.

Cramer [1951 CB 851] estudió los efectos de las ciclodextrinas sobre los espectros de absorción de ciertos colorantes. En la FIGURA 29 se exponen los resultados que se obtienen con naranja de metilo. Como se puede apreciar, los cambios espectrales son diferentes de los que cabría esperar, debido únicamente a una variación del pH. La alta

densidad electrónica de la cavidad de la ciclodextrina desplaza los electrones de la molécula huésped [1952 AgC 136] pero de forma distinta a como lo modifica el proceso de transferencia de H^+ debido a la protección por parte de la ciclodextrina.

También se ha estudiado este hecho en una serie de derivados de colorantes azoicos [1967 JACS 14] así como en nitrofenol, observando que la adición de cantidades crecientes de α -CD produce un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción con puntos isosbéticos a 398 y 446 nm, lo que permite confirmar la formación de un complejo de inclusión con estequiometría 1:1. Los cálculos de las constantes de equilibrio para los distintos colorantes ensayados ponen de manifiesto que la sustitución en las posiciones 4' y 3' en el caso de los derivados de 4'-dimetilaminofenilazo-1-naftaleno-4-sulfonato, tienen una ligera influencia sobre los valores de las constantes de equilibrio y sin embargo afectan considerablemente a las constantes de velocidad de reacción.

Buvari y Barcza [1988 JCSPT 543] han calculado los valores de las constantes de asociación para la anilina, el fenol y sus correspondientes nitroderivados por métodos espectrofotométricos, tanto para las formas disociadas como para las no disociadas. En el caso del p-nitrofenol, el complejo es más estable en el caso de la forma disociada que en el de la no disociada. La deslocalización de la carga y las fuerzas de dispersión de London colaboran a la estabilización del complejo. Los métodos espectrofotométricos se han utilizado ampliamente en el cálculo de las constantes de equilibrio de otros derivados de colorantes y de derivados bencénicos [1977 JACS 5146] [1981 JPC 1820] [1990 JACS 3583].

El indol forma un complejo estable con la β -CD. Los cambios que se producen en su espectro de absorción son semejantes a los observados cuando se comparan los espectros de absorción del indol en agua y en alcohol. Esto implica que el hidrógeno del nitrógeno N_1 del anillo indólico está implicado en la formación de un puente de hidrógeno con alguno de los grupos hidroxilo de la cavidad de la ciclodextrina. Los desplazamientos en el espectro de absorción conjuntamente con las modificaciones observadas en la fluorescencia ayudan a establecer este tipo de conclusiones [1987 JPC 2739].

La 1,8-dihidroxiantraquinona forma complejos con α -, β - y γ -CD, los cuales pueden ser estudiados mediante espectrofotometría UV-VIS gracias a los cambios en el valor del

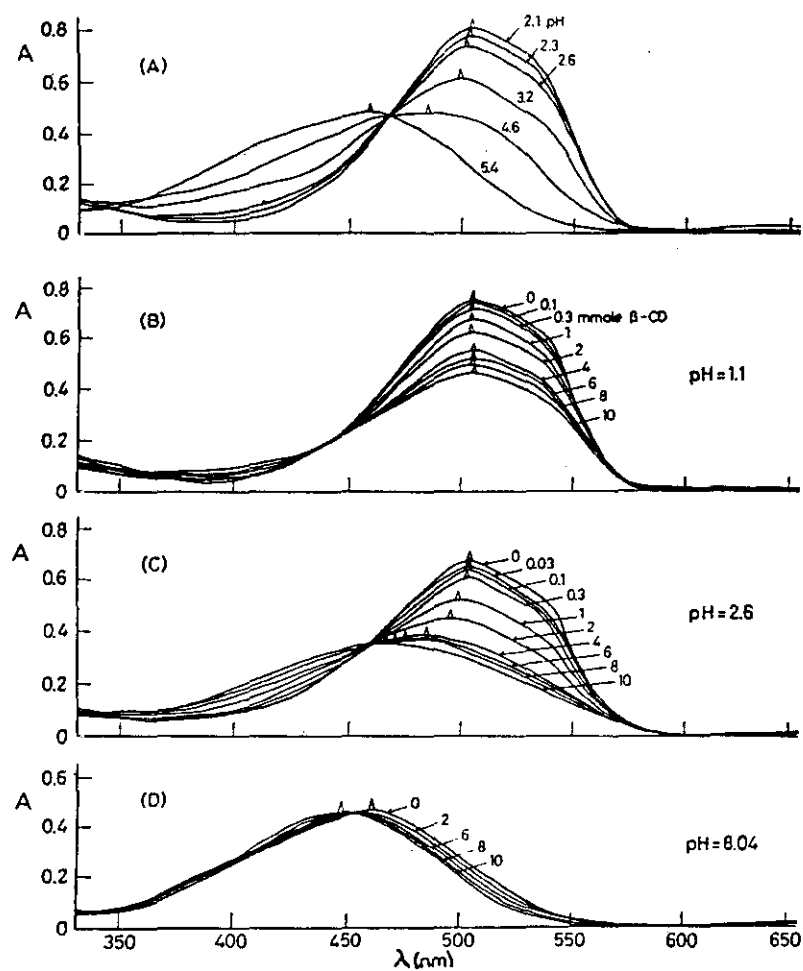


FIGURA 29: Espectros de absorción UV-VIS del naranja de metilo en presencia de cantidades crecientes de ciclodextrina y a distintos valores de pH.

coeficiente de absorción molar (ϵ) como consecuencia del proceso de inclusión. El valor de ϵ se incrementa notablemente con la inclusión, ya que estos derivados de antraquinona son débilmente solubles en agua y presentan valores de ϵ muy pequeños. Los cambios espectrales permiten afirmar que el compuesto incluido es el monómero [1988 JPS 523] ya que es bien conocido que dada su baja solubilidad, estos compuestos tienden a autoasociarse en solución acuosa.

El difenil fosfato forma complejos de estequiometría 1:1 con α -, β - y γ -CD. Las constantes de equilibrio pueden calcularse a partir de los datos espectrofotométricos y la estequiometría se deduce fácilmente a la vista del espectro de absorción [1986 BCSJ 2979]. Este muestra dos puntos isosbéticos, a 228 nm y 254 nm, al aumentar la concentración de ciclodextrina, lo cual es indicativo de la existencia de dos únicas especies en equilibrio y por tanto de una estequiometría 1:1.

Dado que las ciclodextrinas se emplean como agentes solubilizantes y como vehículos de principios activos, el proceso de complejación se puede seguir mediante espectrofotometría UV-VIS. Así, diversos derivados de la fenotiazina [1975 CPB 188] muestran un levísimo desplazamiento hipsocrómico de los máximos de absorción, a la vez que un descenso en el valor del coeficiente de absorción molar tras la formación del complejo de inclusión con β -CD. Los ácidos mefenámico y flufenámico así como otros antiinflamatorios [1975 CPB 201], presentan variaciones en el valor de ϵ al incrementarse la concentración de β -CD en el medio. La existencia de puntos isosbéticos distintos, no claramente definidos en el espectro de absorción, al variar la concentración de ciclodextrina, indica que el mecanismo de interacción es un tanto complejo. También se han observado efectos semejantes en el espectro de absorción UV-VIS tras la formación de complejos de inclusión con distintos derivados de barbitúricos [1976 CPB 1146] y derivados de ácido cinámico [1975 CPB 1421].

Finalmente citaremos una técnica espectrofotométrica empleada en la determinación de las constantes de asociación de complejos de ciclodextrina, en el caso de que los sustratos que se quieren incluir, no absorban en la región visible. Es la denominada técnica espectral de inhibición competitiva o "método del indicador competitivo", en el cual el equilibrio ciclodextrina-sustrato es perturbado o inhibido por la presencia de un indicador coloreado, lo cual tiene como consecuencia un notable cambio espectral. Esta metodología

se ha empleado por ejemplo, para el cálculo de las constantes de asociación de aniones inorgánicos con α -CD [1977 JPC 944] y de los derivados de benceno 1,4-disustituidos también con α -CD [1984 JACS 7607].

II.B.3.3.7.3.4.2 E S P E C T R O S C O P I A S D E LUMINISCENCIA

Las espectroscopias de luminiscencia molecular, en sus vertientes de fluorimetría y fosforimetría son técnicas de gran utilidad en la investigación de los complejos de inclusión, fundamentalmente debido a su extrema sensibilidad. Esta característica las hace apropiadas para estudiar los cambios conformacionales que se producen en las moléculas al pasar del estado fundamental al excitado, así como para profundizar en la geometría de los complejos de inclusión y detectar la existencia de dímeros o monómeros en el interior de la ciclodextrina, gracias al efecto compartimentalizador de éstas en las soluciones acuosas.

La detección del complejo puede establecerse en función de los cambios espectrales observados tanto en el espectro de excitación como en el de emisión, en la mejora o incremento de la intensidad de la luminiscencia, el rendimiento cuántico, las variaciones en los tiempos de vida de los estados excitados, la imposibilidad o mejora en los procesos de formación de excímeros, así como por las modificaciones cuantitativas acaecidas en los procesos de amortiguación de fluorescencia y transferencia de energía.

Si bien el empleo de ciclodextrinas ha permitido observar fosforescencia a temperatura ambiente, lo cual conlleva un cambio cualitativo o cuantitativo muy importante [1984 L LI] [1990 L LII], la espectrofluorimetría se utiliza con mayor frecuencia en la detección de complejos de inclusión, debido a su sensibilidad y mayor versatilidad, por lo que en general hablaremos de mejora en la fluorescencia y de determinaciones espectrofluorimétricas, más que de espectrofotometría.

Las primeras evidencias sobre la utilidad de la espectrofluorimetría en la detección de complejos con ciclodextrinas se las debemos a Cramer [1967 JACS 14], quién observó que el ácido 1-anilino naftaleno-8-sulfónico, que es una molécula fuertemente fluorescente en solventes orgánicos pero que muestra solamente una débil fluorescencia en agua, se

vuelve significativamente fluorescente en soluciones acuosas de ciclodextrina. La α -CD, aumenta dos veces la fluorescencia en solución acuosa, mientras que el efecto de la β -CD es unas diez veces mayor. De forma análoga, los derivados dansilados obtenidos en la reacción con aminoácidos, catecolaminas y péptidos presentan una débil fluorescencia en medio acuoso; por ello antes de su determinación pueden transferirse a un medio apolar en el cual presentan una fluorescencia mayor. Sin embargo se ha observado que la fluorescencia de los dansil derivados en agua puede incrementarse cerca de un orden de magnitud gracias a la adición de β -CD [1973 BBRC 666].

Los bimanos se emplean como reactivos fluorogénicos para marcar proteínas a través de sus grupos tiol. Estos compuestos presentan una débil fluorescencia en solución acuosa y la adición de β -CD incrementa la intensidad de emisión fluorescente entre un 4% y un 25%, sin apreciarse modificaciones en el perfil de los espectros de excitación y emisión fluorescentes de los derivados estudiados [1989 AL 1567].

Los derivados de los ácidos anilino naftalenosulfónico (ANS) y toluidino naftalenosulfónico (TNS) exhiben como ya hemos comentado, una fluorescencia muy sensible a los cambios de polaridad del entorno y por ello se han empleado a menudo como marcadores fluorescentes extrínsecos de proteínas. Catena y Bright [1989 AC 905] han estudiado la influencia de los factores estéricos sobre la formación de los complejos de inclusión con β -CD. Las medidas de fluorescencia son muy útiles para el cálculo de las constantes de equilibrio mediante el tratamiento del "doble recíproco". El 2,6-TNS forma complejos de inclusión tanto de tipo 1:1 como 2:1 [1980 PJ 29] [1988 JPC 3582], a diferencia de otros análogos que únicamente dan lugar a la formación de complejos 1:1. Parece ser que la presencia del sustituyente metílico es un factor clave para que la estequiometría del complejo sea 2:1.

Mediante el empleo de este mismo marcador de fluorescencia, el 2,6-TNS, se ha podido establecer que la mejora en la intensidad de fluorescencia es mucho mayor en el caso de polímeros derivados de ciclodextrina (poli- β -ciclodextrina así como acrilil- β -CD), que proporcionan incrementos en la intensidad de fluorescencia mucho mayores [1977 M 676] que la propia β -CD.

El pireno es otro compuesto utilizado como marcador fluorescente, debido a que las variaciones en las posiciones relativas e intensidad de las bandas denominadas I y III del espectro de emisión fluorescente permiten distinguir variaciones en la polaridad del medio. Asimismo el pireno, por ser un hidrocarburo aromático policíclico, forma excímeros con gran facilidad en solventes polares y en concentraciones superiores a 10^{-4} - 10^{-3} M. Debido a estas peculiaridades y a su notable fluorescencia nativa, se utiliza para el estudio y la exploración de las regiones de distinta polaridad de micelas, polímeros, agregados coloidales y también ciclodextrinas.

Así pues, el cambio en la relación de intensidades de las bandas I y III del espectro de emisión, corrobora la formación del complejo de inclusión entre el pireno y la β -CD y los análogos dimetil- β -CD y trimetil- β -CD. Si bien las constantes de asociación son mayores en el caso de los derivados metilados, en el caso de la β -CD pueden coexistir complejos con distinta estequiometría: P/CD y P/CD₂ principalmente, pero también P₂/CD y P₂/CD₂ [1987 CPL 535].

El incremento en la fluorescencia del pireno es debido, como en el caso de muchos otros fluoróforos, al efecto de solubilización y compartimentalización que ejercen las ciclodextrinas, protegiendo a las especies en estado excitado de los posibles amortiguadores presentes en el medio. No obstante y a pesar de la inclusión, la fluorescencia del pireno es sensible a la presencia de amortiguadores [1985 AC 569], entre ellos el O₂, a concentraciones de β -CD iguales o inferiores a 10^{-3} M. Si se comparan los complejos con α -, β - y γ -CD y el efecto del O₂ a distintas temperaturas, se observa que el fenómeno de amortiguación es mucho mayor en el caso de la γ -CD. Estas observaciones se explican teniendo en cuenta dos supuestos: primero, que a concentraciones bajas de ciclodextrina la concentración de pireno que queda en solución sin incluir es lo suficientemente elevada como para experimentar fenómenos de "quenching" por el O₂ y segundo, que las constantes de Stern-Volmer son mayores en el caso de la γ -CD, es decir que a medida que aumenta el tamaño de la cavidad, los posibles "quenchers" pueden introducirse en la cavidad e interactuar con el pireno en estado excitado [1986 JPC 1963].

Analizando las distintas estequiometrías de los complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y el pireno, se han dirigido estudios hacia los procesos de formación de

excímeros. Así, los cambios espectrales observados, sugieren que la γ -CD forma complejos 2:1 y 2:2 (pireno/ciclodextrina) después de la formación de un complejo 1:1. La existencia de dos moléculas de pireno en el interior de la cavidad de la γ -CD permite observar la emisión del excímero [1983 JCSPT 1031], mientras que la β -CD forma complejos de estequiometría 1:1, no observándose la emisión del excímero. La adición de α - y β -CD no supone una mejora apreciable en la emisión del excímero. Por tanto, cabe esperar que en estos casos sólo se incluya una molécula de pireno por cada molécula de ciclodextrina [1982 CPL 321].

En estudios sobre la formación de complejos ternarios con ciclodextrinas, el pireno se ha ensayado como marcador fluorescente para explorar la polaridad de los complejos ternarios con distintos alcoholes [1988 ACA 251]. La hidrofobicidad del microentorno puede caracterizarse por la relación entre las intensidades de emisión de las bandas I y II. De todos los alcoholes estudiados, el *tert*-butanol es el que proporciona una mejora significativa en la intensidad de fluorescencia. Los dialquil aminobenzonitrilos [1984 PP 597] son compuestos que han sido propuestos para el estudio de la micropolaridad de las ciclodextrinas, debido a los notables cambios que presentan en la emisión, como consecuencia de las variaciones en la polaridad del medio.

La formación de excímeros para el α -naftilacetato sódico ayuda a distinguir los complejos formados por este compuesto y distintas ciclodextrinas. Así, la α -CD no afecta ni a la banda de emisión del monómero ni a la del excímero. La β -CD incrementa la intensidad de emisión del monómero pero no afecta a la banda del excímero, mientras que la γ -CD incrementa las intensidades de emisión de ambas bandas [1980 JCSCC 921].

Debido a la existencia de especies excitadas muy sensibles al entorno, es por lo que la fluorimetría puede emplearse para seguir los procesos de disociación ácido-base en estado excitado de moléculas fluorescentes. Así por ejemplo, se sabe que el 1-naftol forma con la N(N'-formil-L-fenilalanina)- β -CD, una β -CD modificada, complejos de estequiometría 2:1 (CD/naftol). En ausencia de CD se produce la disociación de la molécula en estado excitado y esta especie emite a 470 nm, mientras que con la formación del complejo no se produce la disociación del naftol en estado excitado, ya que se puede apreciar la aparición de la especie emisora a 355 nm para toda la gama de pH [1991 JCSCC 929].

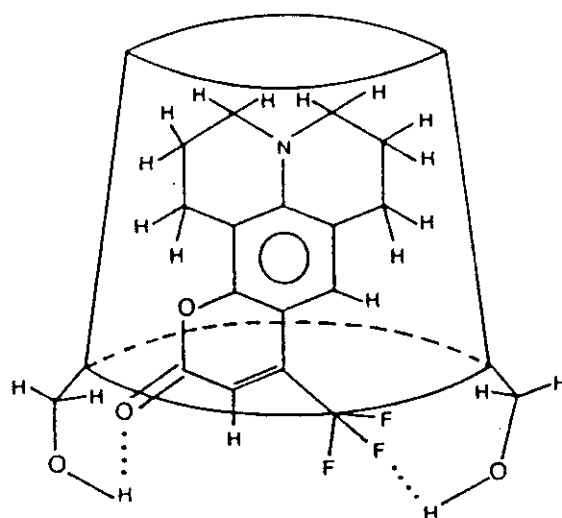
Las cumarinas son compuestos fluorescentes cuya emisión es muy sensible a la variación de pH y a la polaridad del entorno. La existencia de dos tipos de complejos en el caso de la cumarina 540 A puede confirmarse gracias a la extremada sensibilidad de la fluorimetría [1985 JPC 2432]. Como puede observarse en la FIGURA 30, en el "complejo normal" originado con β -CD, la mayor parte de la molécula de cumarina se halla incluida en la β -CD. Además este complejo se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno, por lo que se observa una notable mejora en la intensidad de emisión fluorescente, mientras que en el "complejo invertido", una gran parte de la molécula queda en la fase acuosa externa y resulta ser un complejo menos estable, por lo que se observa un marcado fenómeno de amortiguación de la fluorescencia en presencia de β -CD.

En la FIGURA 31 se pueden apreciar las dos posibles formas de inclusión del metil salicilato en el caso de la α - y la β -CD [1984 PP 185]. La espectrofluorimetría permite elucidar estas posibles formas de inclusión debido a que la emisión del metil salicilato difiere según que el OH fenólico se encuentre formando parte o no de un puente de hidrógeno. En el caso de la α -CD, donde no es posible la formación del puente de hidrógeno, la emisión que se observa es la misma que en el agua.

La formación de excímeros para los derivados de 1,3-di-1-naftil propanona en presencia de ciclodextrinas, permite postular la existencia de dos posibles conformaciones "exo" y "endo" en el interior de la cavidad de la α -CD [1982 PP 325] tal y como se puede apreciar en la FIGURA 32.

La fosforescencia sensibilizada del biacetilo se puede observar en presencia de distintas ciclodextrinas, α -, β -, y γ -CD siendo determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos, como naftaleno, criseno y trifenileno, los que actúan como donadores en el proceso de transferencia de energía triplete-triplete. Para que se produzca este fenómeno es necesario que tanto el donador como el aceptor se incluyan en la cavidad de las ciclodextrinas. En el caso del naftaleno se produce sensibilización para los tres tipos de ciclodextrinas empleadas. Sin embargo, el criseno y el trifenileno, al ser moléculas de mayor tamaño, sólo inducen la fosforescencia del biacetilo en el caso de la γ -CD [1985 Ta 665].

A



B

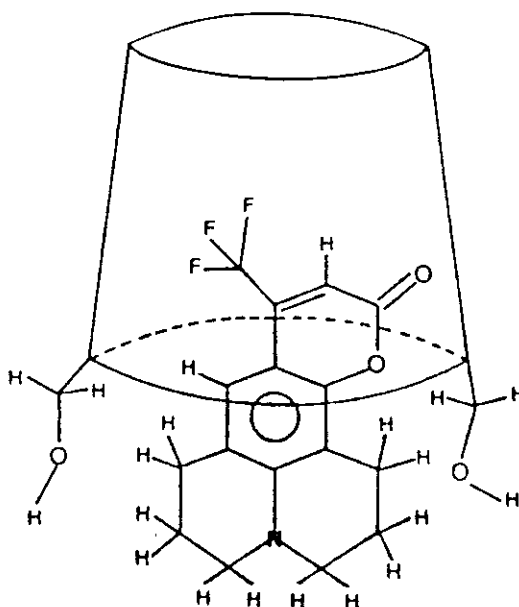


FIGURA 30: Complejos de inclusión de β -CD con la cumarina 540 A. (A) "complejo normal", (B) "complejo invertido".

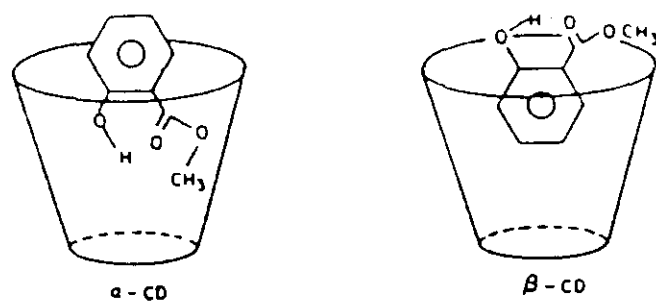


FIGURA 31: Modos de inclusión propuestos para el salicilato de metilo con α -CD y β -CD.

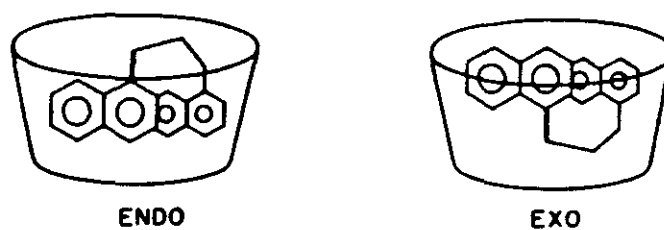


FIGURA 32: Conformaciones posibles adoptadas por el DNP en la formación de un complejo de inclusión con la γ -CD.

La α -, β - y γ -CD forman complejos con difenilfosfato; las modificaciones en la emisión fluorescente de esta molécula ponen de manifiesto que un sólo grupo fenilo entra en las cavidades de α - y β -CD, mientras que en la cavidad de la γ -CD pueden entrar los dos grupos fosfato. La estequiometría de los complejos es en todos los casos 1:1 [1986 BCSJ 2979].

II.B.3.3.7.3.4.3 DICROISMO CIRCULAR

El dicroismo circular permite la detección de complejos de inclusión con ciclodextrinas en solución acuosa. Cuando una molécula huésped aquiral se incluye en la cavidad de la ciclodextrina, se puede apreciar un efecto Cotton inducido en las proximidades de los máximos de absorción como consecuencia del fenómeno de inclusión. En otras palabras, la formación del complejo de inclusión induce actividad óptica en compuestos que no la poseen [1975 BCSJ 375], en parte debido al proceso de inclusión en sí mismo y en parte debido a los cambios conformacionales que se producen en la cavidad de la ciclodextrina [1970 JCS 877]. El signo de la actividad rotatoria o lo que es lo mismo del efecto Cotton inducido, depende de la relación espacial entre el centro de simetría y el cromóforo perturbado. La intensidad del efecto depende sin embargo de la rigidez del complejo formado.

Harata [1975 BCSJ 375] propone, de acuerdo con estudios teóricos, que aquellas transiciones con un momento dipolar eléctrico paralelo al eje de la ciclodextrina presentan un efecto Cotton positivo, mientras que las transiciones con un momento dipolar perpendicular al eje de la ciclodextrina originan un efecto Cotton negativo. En concordancia con estos supuestos, Uekama y col. [1978 CL 703] han demostrado que la tolbutamida produce un complejo con efecto Cotton negativo en el caso de la α -CD, mientras que con la β -CD el efecto es positivo.

Como ya hemos dicho, muchos autores consideran esta técnica como la más apropiada para investigar complejos de inclusión. Así, según Trisnadi [1974 CPS 222], el efecto Cotton solamente se observa cuando las moléculas están realmente incluidas en la cavidad de la ciclodextrina. Por ello se ha empleado como prueba de confirmación en estudios de complejación con ciclodextrinas.

Diversos derivados de fenotiazina forman complejos de inclusión con β -CD [1975 CPB 188]. Los estudios de dicroísmo circular revelan que la orientación del anillo de fenotiazina es el mismo en todos los derivados estudiados, ya que en todos los casos la intensidad del efecto en la banda de menor longitud de onda es mayor que en la banda que aparece a menor energía (FIGURA 33). Sin embargo las fenotiazinas N-sustituídas generan efectos positivos y negativos en las distintas bandas, lo que implica un mecanismo de inclusión más complicado (FIGURA 34).

Se sabe que diversos antiinflamatorios derivados del ácido flufenámico [1975 CPB 201] forman complejos de inclusión con β -CD gracias a las bandas de absorción observadas mediante dicroísmo circular. Cada uno de los derivados estudiados posee distinto entorno asimétrico en la β -CD. Mientras unos presentan efecto Cotton positivo, otros lo presentan negativo o bien una mezcla de ambos, lo que implica para cada una de las moléculas, una distinta orientación con respecto al eje de la ciclodextrinas. Estos mismos autores [1976 CPB 1146] llegan a conclusiones semejantes empleando dicroísmo circular en el estudio de los complejos de derivados de ácido barbitúrico con α - y β -CD, llegando a la conclusión de que la α -CD es demasiado pequeña para permitir la inclusión total del compuesto.

Si se comparan los efectos Cotton inducidos para α - y β -CD en una serie de complejos formados con ácido cinámico y análogos [1975 CPB 1421], se puede apreciar que en todos los casos el efecto es positivo, lo cual supone una misma orientación en la cavidad. Sin embargo, la magnitud del fenómeno varía de forma muy apreciable según se trata de isómeros *cis* o *trans* y del tipo de ciclodextrina.

Yamaguchi y Ninomiya [1981 SpA 119] han seguido la formación de complejos de inclusión de fluoreno, carbazol, dibenzofurano y dibenzotiofeno mediante dicroísmo circular. Suponiendo que estos compuestos no pueden formar complejos ecuatoriales con β -CD en función del tamaño de la CD y de estas moléculas, cabe esperar que la orientación de los cromóforos sea en todos los casos paralela al eje de la CD y por tanto el efecto Cotton observado debería ser positivo. Esto sucede para todas las bandas de absorción en el fluoreno, pero en el resto de los compuestos estudiados las bandas que corresponderían a longitudes de onda mayores presentan un efecto Cotton negativo de baja intensidad, lo cual revela una distinta orientación de estos cromóforos con respecto al eje de la

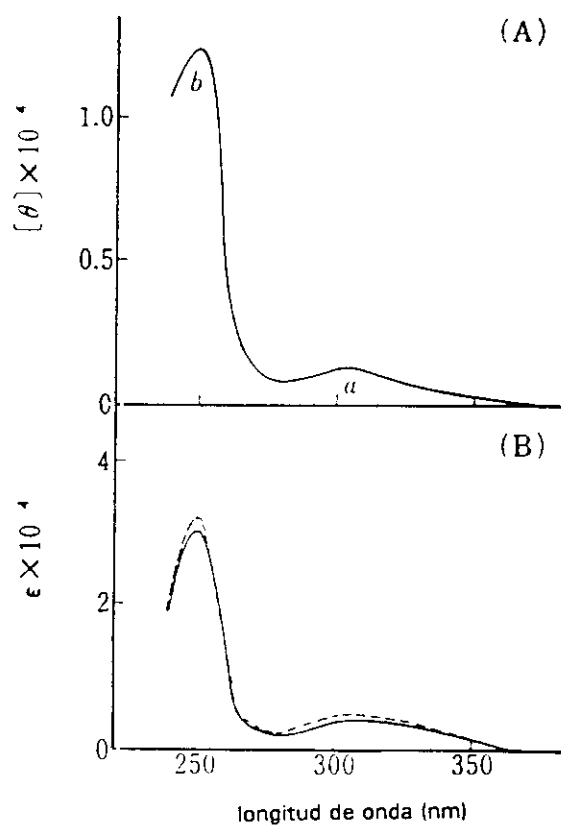


FIGURA 33: Dicroísmo circular (A) y espectro de absorción UV-VIS (B) del complejo de inclusión fenotiazina/ β -CD

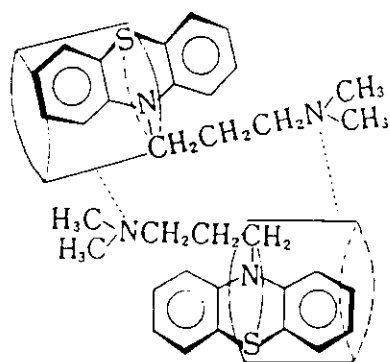


FIGURA 34: Estructuras propuestas para los complejos de inclusión entre β -CD y fenotiazinas N-sustituidas

ciclodextrina. Sin embargo se considera que el dicroismo circular no da información suficiente sobre la orientación de estas transiciones.

En el caso de moléculas cuyo tamaño es pequeño con respecto a la cavidad de la β -CD, como es el caso de los derivados monosustituídos de benceno [1979 BCSJ 2678], se puede pensar en la existencia de dos posibles orientaciones en la cavidad de la ciclodextrina, una paralela al eje de ésta y otra perpendicular. Los estudios de dicroismo circular inducido muestran la existencia tanto de transiciones con efecto Cotton positivo, como con efecto Cotton negativo. Si la orientación fuese paralela debería observarse efecto Cotton positivo. Este comportamiento, que es concordante con los cálculos teóricos, se explica teniendo en cuenta que determinadas transiciones están polarizadas a lo largo del eje de la ciclodextrina, lo que da lugar a un signo positivo, mientras que otras muestran este efecto, pero con respecto al eje pequeño de la ciclodextrina, lo que da lugar a un efecto negativo .

En un estudio posterior de los autores antes mencionados sobre una serie de derivados bencénicos *o*-, *m*- y *p*-disustituídos [1981 BCSJ 513], se deduce de los estudios de dicroismo circular que los *o*- y *m*-derivados no pueden agruparse en inclusión axial o ecuatorial de forma inequívoca. De esta forma, la orientación de la molécula en la cavidad puede deducirse con exactitud sólo cuando se conoce la dirección del momento dipolar eléctrico de transición.

Dos isómeros ópticamente inactivos, el 5-metoxipsoraleno y el 8-metoxipsoraleno, muestran distinta afinidad por la β -CD, siendo mucho mayor en el caso del 5-metoxi derivado. En este caso se puede demostrar la existencia de un verdadero complejo de inclusión para este compuesto, ya que induce dicroismo circular con efecto Cotton positivo, mientras que el 8-metoxipsoraleno no es capaz de provocar tal fenómeno [1988 JPPB 455].

La existencia de DC se ha podido demostrar también para otras ciclodextrinas modificadas como la 2,6-dimetil- β -CD y la β -CD polimerizada en el caso de ciertas moléculas huéspedes aromáticas [1982 ACASH 327].

En resumen, cuando una molécula aquiral se incorpora al interior de la ciclodextrina, se modifica la actividad óptica asociada a determinadas transiciones de los grupos cromóforos, debido a la excitación asimétrica de los electrones del cromóforo como consecuencia de la interacción con los grupos hidroxilo de la ciclodextrina. Todo ello constituye una de las pruebas más fiables para demostrar la existencia de un verdadero complejo de inclusión.

II.B.3.3.7.3.4.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) proporciona información muy valiosa acerca de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas debido a que el estudio de los espectros de RMN permite esclarecer las relaciones geométricas y la disposición de la molécula huésped en el interior de la cavidad de las ciclodextrinas, así como las características dinámicas de los complejos en solución acuosa, a partir de las variaciones en el valor del desplazamiento químico y de las constantes de acoplamiento. Asimismo, la introducción de nuevas técnicas NOE (Nuclear Overhauser Effect) y las medidas de tiempos de relajación, facilitan el estudio de estos complejos.

Aunque se pueden realizar distintos tipos de RMN, las más difundidas son las de ^{15}N , ^1H y ^{13}C . La ^1H -RMN permite la obtención de espectros en solución acuosa deuterada. Puesto que la mayoría de los complejos con ciclodextrinas se estudian en agua, es por tanto la más ampliamente difundida. Sin embargo, por regla general los complejos con ciclodextrina presentan una solubilidad en D_2O muy baja, lo que dificulta la obtención de los mismos al tener que trabajar a bajas concentraciones de ciclodextrina. Por el contrario, la ^{13}C -RMN permite la obtención de los espectros en agua donde la solubilidad es mayor, pero dado que es menos sensible necesitan emplearse concentraciones más elevadas de ciclodextrina y complejo.

El empleo de otros solventes orgánicos deuterados puede alterar y descomponer el complejo. El DMSO o el dioxano parecen ser los solventes más apropiados para la obtención de los espectros debido a su elevada polaridad, a la vez que contribuyen a mantener la estabilidad del complejo.

¹H -RMN

La detección de complejos de inclusión mediante esta técnica se basa en las variaciones en el valor del desplazamiento químico de los protones δ , ya sea de la ciclodextrina, ya sea de la molécula incluida.

Debido a la conformación "silla" que adoptan las unidades de glucosa en la ciclodextrina, los átomos de H correspondientes a los carbonos 3 y 5 de la ciclodextrina (H_3 y H_5) se sitúan orientados hacia el interior de la cavidad, mientras que los H_1 , H_2 , H_4 y H_6 se localizan hacia el exterior, tal y como se aprecia de forma esquemática en la FIGURA 35. Cuando la molécula huésped se acomoda en el interior de la cavidad de la ciclodextrina, de alguna manera interacciona con ella y perturba el entorno de sus hidrógenos. Esto se manifiesta en un cambio en el valor del desplazamiento químico hacia campos más altos (valores más bajos de δ) en los protones localizados hacia el interior de la cavidad. Por el contrario los protones H_1 , H_2 , H_4 y H_6 muestran un desplazamiento marginal. El efecto de "protección anisotrópica", así como el efecto "microsolvente" o lo que es lo mismo, el aumento de la hidrofobicidad de la cavidad de la ciclodextrina debido a la inclusión que conlleva el desplazamiento de las moléculas, explica la variación del desplazamiento químico a campos más altos.

Komiyama y col. [1980 CL 1471] estudiaron la inclusión de diversos derivados aromáticos, entre ellos el ácido benzoico, considerando el efecto de protección anisotrópica de los H_3 y H_5 . Según sus cálculos, ambos protones se desplazan a campos más altos cuando la molécula está incluida de forma completa, mientras que sólo se desplaza el protón H_3 si se incluye de una forma parcial.

Thakkar y Demarco [1971 JPS 652] estudiaron la inclusión de distintos barbitúricos, relacionando las constantes de estabilidad del complejo con los valores de desplazamiento químico del protón H_5 . El desplazamiento δH_5 es despreciable, lo que les permite suponer que la molécula penetra a través de los hidroxilos primarios, siendo el anillo aromático el que penetra; pero la inclusión no es tan profunda como si se tratase sólo de una molécula aromática [1970 JCSCC 2]. Asimismo el ajuste de la ciclodextrina a moléculas con cadenas alifáticas parece ser bastante débil, ya que las constantes de formación y las variaciones en el valor del desplazamiento químico así lo demuestran.

Otagiri y col. han estudiado las características de inclusión de distintos complejos por ^1H -RMN. Así, ciertas fenotiazinas [1975 CPB 188] provocan desplazamientos en H_5 y H_3 , al mismo tiempo que un ensachamiento en H_1 , H_2 y H_4 , lo que les permite afirmar que si bien el anillo aromático queda en el interior de la cavidad, la asociación tiene lugar al menos también parcialmente de forma externa. Ciertos derivados del ácido flufenámico [1975 CPB 201] provocan desplazamientos similares en las señales de los protones H_5 y H_3 , con un ensanchamiento muy apreciable a medida que se incrementa la concentración de ácido flufenámico con respecto a la concentración de ciclodextrina. Sin embargo, dado que los desplazamientos son muy pequeños, puede pensarse en que los puentes de hidrógeno con los grupos $-\text{OH}$ de las ciclodextrinas juegan un papel muy relevante en el proceso de asociación. Sus estudios sobre barbitúricos [1976 CPB 1146] son concordantes con los de Thakkar. Sin embargo Otagiri propone que tanto el anillo aromático como el heterocíclico se incluyen en el interior de la ciclodextrina, quedando en el exterior el grupo carbonílico. Para el caso del ácido cinámico y análogos [1975 CPB 1421] en el que se observa la formación de complejos 2:1 (ciclodextrina/ácido cinámico), las variaciones en el valor del desplazamiento químico de los protones H_5 y H_3 a campos más altos permiten afirmar que el anillo aromático es el que se incluye en la cavidad.

Wood y col. [1977 JACS 1735] han estudiado la inclusión de la *p*-yodoanilina y el *p*-nitrofenol a distintos pH mediante resonancia protónica. Los cambios en el valor de δ para los H_5 , H_3 y H_6 y la ausencia de variaciones en los H_1 , H_2 y H_4 les ha llevado a proponer que tanto en el caso de la forma ionizada como en el de la no ionizada, el anillo aromático es el que queda incluido en el interior de la cavidad.

La variación en el valor del desplazamiento químico con respecto a la concentración de sustrato hace posible el cálculo de las constantes de disociación de los complejos formados entre α -CD y los iones *p*-nitrofenolato (3.7×10^{-4} M), 2,6-dimetil-4-nitrofenolato (1.96×10^{-4} M) y 3-metil-4-nitrofenolato (3.5×10^{-2} M), enlazándose más débilmente las formas no disociadas que las disociadas [1977 JACS 5146].

La espironolactona forma un complejo con la β -CD cuya existencia se demuestra por los desplazamientos a campos más altos de las señales de los protones H_5 y H_3 [1989 CaR 313]. Un razonamiento análogo permite verificar la formación de complejos de inclusión entre β -CD y compuestos quirales como (+), (-) y (\pm) mentol [1988 JC 175].

¹³C-RMN

La resonancia de carbono 13 tiene la gran ventaja de poderse realizar en agua directamente. Sin embargo dada su baja sensibilidad se requieren concentraciones de complejo muy elevadas. En los últimos años la introducción de equipos instrumentales de gran potencia, así como el empleo de técnicas de resolución temporal, han permitido soslayar estos problemas.

Dado que en cada unidad de glucosa sólo hay seis carbonos, el espectro de ¹³C-RMN de las ciclodextrinas es mucho más sencillo que el de ¹H-RMN. La inclusión se establece por las variaciones en el valor de δ producidas como consecuencia de la inclusión de los carbonos correspondientes a la molécula huésped. En este último caso el cambio en el valor de los desplazamientos químicos de la molécula huésped se debe a la variación del microentorno eléctrico de la molécula como consecuencia del proceso de inclusión.

Así, Inone [1985 JACS 2319] considera el fenómeno de inclusión de diversos derivados de benceno, ácido benzoico y *p*-hidroxibenzoico entre otros, como un cambio en la polaridad del microentorno al ser transferida la molécula desde la fase acuosa a la α -CD y relaciona los cambios en los valores de δ tras la formación del complejo con las variaciones en el valor de δ al variar la polaridad del solvente. Asimismo estas variaciones permiten determinar la geometría de los complejos de inclusión formados.

En un estudio posterior sobre compuestos análogos [1985 CaR 12], permitieron demostrar que a medida que se favorece la complejación de *p*-nitrofenol con β -CD, las señales correspondientes al derivado bencénico se van ensachando, llegando prácticamente a desaparecer debido a la inclusión.

Komiyana e Hirai [1981 BCSJ 828] estudiando derivados de benceno y las características de los complejos de éstos con α -CD, relacionaron la variación del valor de δ con la capacidad de penetración de estas moléculas en la cavidad.

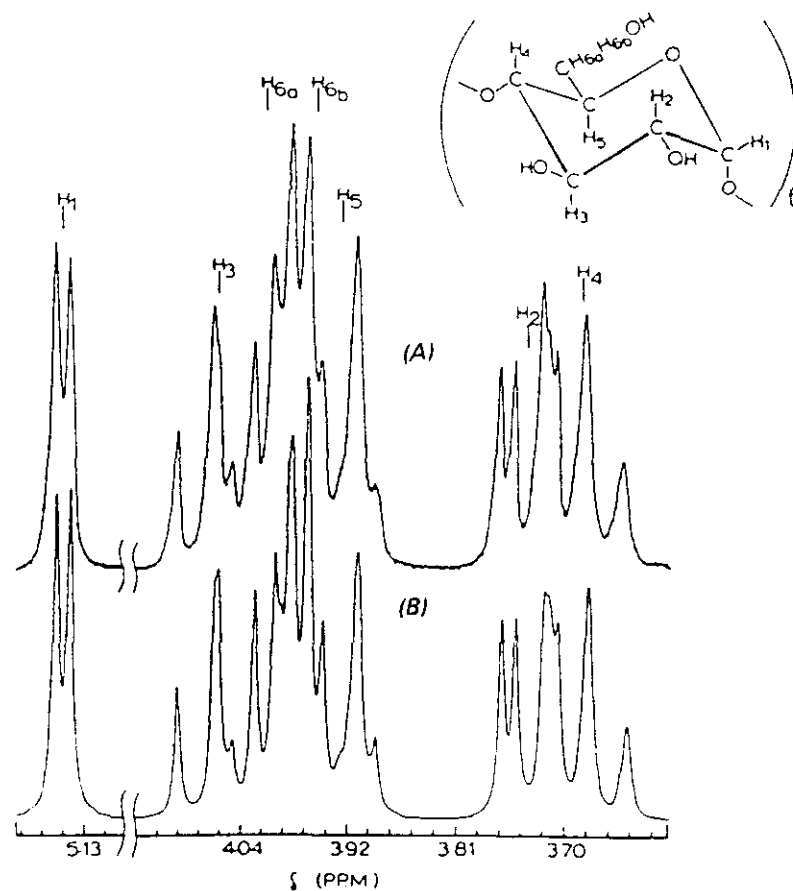


FIGURA 35: Espectro de ^1H -RMN (280 MHz) de la α -CD disuelta en D_2O . (A) Espectro obtenido experimentalmente, (B) espectro teórico simulado por ordenador,

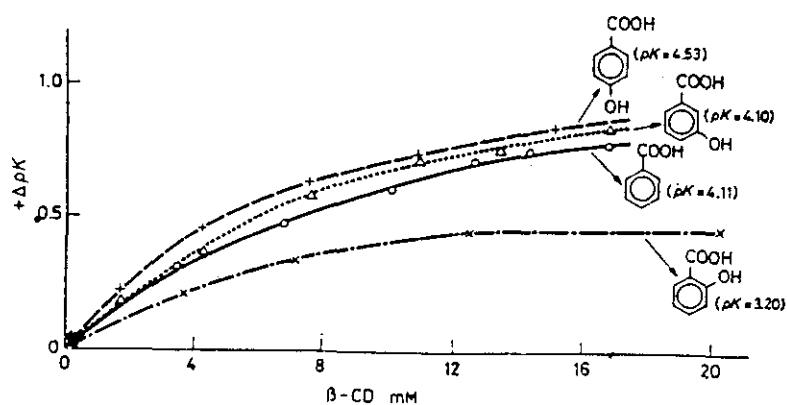


FIGURA 36: Variación de los valores de pK_a de distintos derivados de ácido hidroxibenzoico en función de la concentración de β -CD.

II.B.3.3.7.3.4.5 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA DE ESPIN ELECTRONICO

Esta técnica resulta de gran utilidad para el estudio de las propiedades de un gran número de complejos en solución. Sin embargo presenta el inconveniente de que las moléculas que se estudian deben ser paramagnéticas (generalmente radicales libres) o bien hallarse marcadas con "marcadores de espín". No obstante, puesto que las ciclodextrinas tienen una gran utilidad en catálisis, se han utilizado para detectar la presencia de ciertos radicales libres que se forman en el curso de estas reacciones [1979 JACS 4337] [1984 JPC 3163]. Las constantes de acoplamiento hiperfino son muy sensibles a los cambios en la polaridad del entorno, por lo que su variación puede utilizarse igualmente para detectar el proceso de inclusión. Así, cuando el 2,2,5,5-tetrametil-3-carbamidopirrolodina-1-oxil se incluye en la β -CD, la constante de acoplamiento desciende de 16'51 gauss a 15'80 gauss, de forma semejante a la variación que experimentaría esta molécula si se transfiriese de un solvente más polar a otro menos polar [1979 BioC 211].

II.B.3.3.7.3.4.6 POTENCIOMETRIA

Las constantes de disociación de ácidos y bases orgánicos varían debido a la inclusión en la cavidad apolar de las ciclodextrinas. La variación en el valor del pK_a con la concentración de ciclodextrina (FIGURA 36) puede emplearse en ciertos casos para el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos. La variación en el pK_a constituye por tanto una forma útil de detectar la formación del complejo [1982 JPS 217].

En general, el proceso de inclusión conduce a un incremento en el valor del pK_a de los ácidos, mientras que disminuye para los compuestos básicos. Dada la hidrofobicidad de la cavidad, normalmente se favorece la inclusión de las formas no ionizadas, tanto de ácidos como de bases. Así pues, en el caso de un ácido débil se producirá un incremento en el valor del pK_a debido a que en el complejo formado la forma no ionizada es más estable que la ionizada. Sin embargo, en muchos casos la formación del complejo obedece a razones estructurales y puede ocurrir que las formas ionizadas sean más estables para la formación del complejo, lo que da lugar a un descenso en el valor del pK_a .

Este hecho se presenta de forma clara en el caso de los fenoles. En concreto, el valor del pK_a de los *p*-nitrofenoles [1976 JPS 379] desciende con la formación del complejo lo que implica que la forma ionizada se ve favorecida en el caso de la inclusión. Este comportamiento es el contrario al que se observa en los ácidos carboxílicos y Connors [1983 JPS 1333] lo explica en su estudio sobre nueve derivados fenólicos *p*-sustituidos diciendo que el efecto de la deslocalización de la carga conduce a la inclusión en el caso de la forma ionizada. Asimismo, considera que la densidad electrónica sobre el *p*-sustituyente es mayor en el anión que en la forma neutra, lo cual explica que las constantes de estabilidad de los complejos sean mayores en los aniones que en las formas neutras.

Por el contrario, los ácidos carboxílicos muestran un incremento en el valor del pK_a con el proceso de inclusión [1979 BioC 263] [1980 BioC 450] [1982 JPS 217], como ocurre por ejemplo con los derivados de adamantano carboxílico, para los que se pueden apreciar incrementos en el valor del pK_a comprendidos entre 1 y 2'5 unidades. Además las constantes de estabilidad son sensiblemente superiores a pH ácido que a pH alcalino [1989 JACS 6765]. Un comportamiento semejante se observa en el grupo carboxílico de las prostaglandinas [1978 CPB 1195] o del ácido cinámico y derivados [1980 JPS 173], así como para el grupo amino de los barbitúricos [1976 CPB 1155] para el que se demuestra la inhibición de la protonación tras la formación del complejo. La influencia del pH sobre el equilibrio de complejación, en el caso de distintos solventes orgánicos (etanol, 2-propanol, dioxano, DMSO, fenol) se ha podido establecer también mediante métodos potenciométricos [1982 JACS 6283].

II.B.3.3.7.3.4.7 METODOS VOLTAMETRICOS

Los métodos voltamétricos son útiles para verificar la inclusión de sustancias electroactivas en el interior de la cavidad de las ciclodextrinas, ya que la formación de complejos conlleva la modificación de los potenciales redox de los sustratos que se van a incluir. En consecuencia, los desplazamientos en el potencial de semionda en presencia de ciclodextrinas se han utilizado para demostrar la inclusión, en el caso de nitrofenoles [1977 H 1833] y clorpromazina [1984 CPB 839] entre otros. Algunos autores [1982 L XXXIVb] han estudiado la diferencia de comportamiento frente al oxígeno de la α - y la β -CD. La

β -CD es unas veinte veces más efectiva que la α -CD en hacer descender la onda de reducción del oxígeno.

II.B.3.3.7.3.4.8 CONDUCTIMETRIA

La formación de complejos de inclusión de moléculas ionizables puede estudiarse por conductimetría ya que la conductancia equivalente de las moléculas huésped disminuye con la complejación, debido al incremento en el diámetro del anión. De esta forma se han podido calcular las constantes de estabilidad de los complejos de iones de gran tamaño, como el dodecilsulfato sódico y el bromuro de trimetilcetilamonio con ciclodextrinas [1976 JPC 2661] [1988 CJC 325].

II.B.3.3.7.3.4.9 CROMATOGRAFIA

La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas solubles en la fase móvil que se emplea en un proceso de separación cromatográfica, altera los valores del tiempo de retención o de R_f . Así pues, cuando en cromatografía líquida se añaden ciclodextrinas a la fase móvil, los tiempos de retención se acortan, dependiendo del valor de la constante de asociación del complejo [1977 JPS 706]. En consecuencia, estudiando la variación en el valor del tiempo de retención con respecto a la concentración de ciclodextrina puede calcularse el valor de la constante de asociación de los complejos [1978 CL 661] [1978 CPB 3477]. La modificación de estos parámetros cromatográficos se ha empleado con fines analíticos [1988 JPPB 455] [1989 AC 422] [1991 AC 1018] [1991 AC 2924]. Esto explica por qué los fenómenos de reparto se vean modificados como consecuencia de la variación de la solubilidad de los complejos con respecto a la molécula no incluida.

II.B.3.3.8 SELECTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION CON CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas, al igual que los agregados micelares, poseen la propiedad de compartimentalizar u organizar los medios fluidos, englobando a las moléculas en el interior de la cavidad apolar e hidrofóbica y aislando de este modo unas moléculas de otras [1985 ACA 3] [1985 ACA 355]. En este sentido, las ciclodextrinas aportan ciertas ventajas sobre las micelas, ya que en el caso de las ciclodextrinas se produce un reconocimiento

específico (reconocimiento molecular) de la molécula que se quiere incluir en el interior de la cavidad. En ambos casos las fuerzas conductoras para la organización del medio acuoso son de naturaleza hidrofóbica y contribuyen a la solubilización de compuestos orgánicos insolubles o débilmente solubles en agua, incorporándolos a los medios acuosos y permitiendo así la cuantificación de los mismos en agua.

Sin embargo, en el caso de las ciclodextrinas, para que se produzca la organización, esto es para que se forme el complejo de inclusión, además de las interacciones hidrofóbicas es imprescindible que se cumplan una serie de requerimientos geométricos y estructurales. El tamaño fijo de dicha cavidad en las ciclodextrinas, conduce a un mecanismo de solubilización/inclusión, dando lugar a especies de estequiometría definida. Este hecho condiciona una gran selectividad, de tal forma que pueda darse el caso de que un compuesto pueda incluirse en una ciclodextrina y un análogo estructuralmente relacionado no pueda hacerlo.

Así por ejemplo, se produce una complejación selectiva de la β -CD con naftaleno y 1-fenilnaftaleno que permite diferenciar ambos compuestos en una mezcla mediante técnicas de luminiscencia [1983 SpA 1421] [1984 IL 60]. La β -CD es capaz de incluir la molécula de naftaleno, lo cual tiene como consecuencia el que se pueda observar la emisión fosforescente de este compuesto. Sin embargo esta ciclodextrina no incluye favorablemente al 1-fenilnaftaleno, lo que impide que se observe la fosforescencia, pudiéndose apreciar únicamente la fluorescencia. Ambos compuestos se pueden diferenciar ya que las emisiones de fluorescencia y fosforescencia están separadas aproximadamente unos 100 nm en la región espectral comprendida entre 300 y 700 nm.

Compuestos relacionados estructuralmente, esto es isómeros, muestran distinta afinidad en el fenómeno de inclusión por la α - y la β -CD, lo que se refleja en mejoras notables o por el contrario apenas significativas en la luminiscencia tras la formación del complejo de inclusión. Este es el caso de los bifenilos policlorados (PCBs), compuestos que es necesario determinar mediante técnicas muy sensibles dada su importancia como contaminantes atmosféricos [1981 AC 1183]. Así pues, mientras el bifenilo se incluye totalmente tanto en la α -CD como en la β -CD, el 4-clorobifenilo lo hace totalmente sólo en el caso de la β -CD y parcialmente en la α -CD, y el 4,4-diclorobifenilo se incluye también

en la β -CD, pero no en la α -CD. El estudio de estos compuestos se realiza mediante la medida del incremento en la señal de fluorescencia tras la formación del complejo [1984 AC 331] [1985 EST 155].

El 5-metoxipsoraleno y el 8-metoxipsoraleno pueden diferenciarse asimismo por su distinta afinidad en la formación del complejo con β -CD. En el caso del 5-derivado se produce la inclusión, lo cual se demuestra por un desplazamiento hipsocrómico del máximo de fluorescencia a la vez que por una considerable mejora en la intensidad de emisión. Por el contrario, las características espectrofluorimétricas del 8-metoxiderivado apenas se modifican. Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la aparición de dicroísmo circular inducido en las transiciones de absorción para el 5-metoxipsoraleno pero no en el caso del 8-metoxipsoraleno. De todo ello se concluye que el 5-metoxipsoraleno se incluye en la β -CD con una constante de afinidad del orden de 400 M^{-1} . Igualmente se modifican los tiempos de retención en HPLC para ambos compuestos, si bien en el caso del 5-metoxiderivado se produce además un incremento en la altura del pico al aumentar la concentración de ciclodextrina en la fase móvil. En resumen, el 5-metoxipsoraleno muestra una afinidad mucho mayor que el 8-metoxipsoraleno por los medios hidrofóbicos, lo cual tiene importantes repercusiones biológicas y farmacológicas y ello se puede comprender a través del estudio de la formación del complejo de inclusión [1988 JPPB 455].

La selectividad de las ciclodextrinas para acomodar en su interior moléculas huésped relacionadas estructuralmente y dar lugar a complejos de características diferentes (lo que permite la diferenciación de las moléculas huésped) no sólo se reduce al caso de los isómeros sino también al de los compuestos ionizables. Según estén ionizadas o no las moléculas, el modo de inclusión difiere, lo que repercute en las características espectroscópicas del complejo así como en los valores de las constantes de afinidad.

Tanto la espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica como de ^{13}C [1976 BioC 425] [1977 JACS 5146] han permitido el estudio del modo de inclusión del *p*-nitrofenol así como de su anión correspondiente (*p*-nitrofenolato) en el interior de la cavidad de la α -CD. Tanto la forma ionizada como la no ionizada penetran en la cavidad por el extremo del grupo nitro penetrando asimismo el anillo aromático. No obstante si se comparan las constantes de disociación de los complejos formados, se aprecia que la estabilidad del complejo es unas cien veces mayor en el caso del *p*-nitrofenol que para su

correspondiente forma ionizada. Esto se explica teniendo en cuenta que el anión es mucho más hidrosoluble. Asimismo, si se compara una serie homóloga de metil y dimetil derivados de *p*-nitrofenol, se observa que la introducción de grupos metilo en las posiciones 2 y 6 debilita la interacción con la α -CD, disminuyendo el valor de las constantes de disociación en un factor de aproximadamente 2'4. Sin embargo la introducción de un metilo en posición 3 produce una drástica disminución de la constante de disociación (del orden de cien veces menor), mientras que la sustitución de las posiciones 1 y 5 inhibe completamente la complejación [1977 JACS 5146]. En consecuencia el impedimento estérico en torno al grupo nitro juega un papel singular en el fenómeno de la complejación.

Si se comparan las constantes de asociación de las formas disociada y no disociada del *p*-nitrofenol y la *p*-nitroanilina [1988 JCSPT 543], se deduce que las interacciones más fuertes se producen en el caso de los *p*-nitroderivados que conducen a complejos de mayor estabilidad, siendo el *p*-nitrofenolato el compuesto para el cual la constante de asociación es mayor. De ello se deduce que la existencia de formas resonantes que contribuyen a la deslocalización de las cargas y las interacciones por fuerzas de dispersión de London son los factores que contribuyen a la estabilización de los complejos.

Eftink y col. [1989 JACS 6765] realizaron un profundo estudio sobre las características de los complejos de inclusión con distintos derivados de ácidos carboxílicos (adamantano carboxílico y biciclo-(2,2,2)-octanocarboxílico) con una misma estructura base y distintos sustituyentes. Los estudios de desplazamiento espectral, microcalorimetría de flujo y determinación potenciométrica de las constantes de acidez ponen de manifiesto la existencia de complejos 1:1 con β -CD. Con α -CD se forman complejos 1:1 en el caso de las especies ionizadas y complejos 2:1 a pH bajo. La formación de complejos 2:1 transcurre por vía cooperativa. El cálculo de las constantes de asociación a distintos valores de pH para la β -CD, refleja una interacción más fuerte a pH bajo que a pH neutro o alcalino, donde existen formas carboxilato. Por otra parte, el tamaño del huésped modifica las constantes de disociación en aproximadamente dos órdenes de magnitud. El valor de K_a disminuye con el tamaño del huésped. La entalpía y la energía libre dependen mucho del tamaño del ácido carboxílico. Estos parámetros pueden por ello emplearse para establecer la magnitud del efecto hidrofóbico y la intensidad de las fuerzas de Van der Waals.

Cramer y col. [1967 JACS 14] observaron que el 1-anilino-naftaleno-8-sulfonato que es una molécula fuertemente fluorescente en disolventes orgánicos pero que muestra una débil fluorescencia en agua, se vuelve significativamente fluorescente en soluciones acuosas de ciclodextrina, del orden de la que exhibe en etanol. La α -CD aumentaba unas dos veces la fluorescencia en solución acuosa, mientras que el efecto de la β -CD fue unas diez veces mayor. Este hecho se explica teniendo en cuenta que la cavidad de la α -CD es demasiado pequeña como para englobar por completo al resto naftalenosulfonato. Se han observado incrementos en la intensidad de fluorescencia tras la adición de CD para otros análogos como el 6-*p*-toluidinilnaftaleno-2-sulfonato [1976 JB 393] y los derivados 1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfonil-dansilo [1973 BBRC 666].

Si se comparan las constantes de asociación para los complejos obtenidos entre β -CD y una serie de derivados de benceno (benceno, anilina, fenol, ácido benzoico y etoxibenceno) calculadas a partir de datos espectrofotométricos y espectrofluorimétricos, se demuestra que si bien la β -CD es capaz de englobar a todos los derivados estudiados, la afinidad de la β -CD se incrementa aproximadamente veinte veces para la serie anilina, N-metilanilina, N,N-dimetilanilina y N,N-di-etilanilina [1981 JPC 1820], permitiendo distinguir unas aminas de otras gracias a los rendimientos cuánticos de fluorescencia.

En un estudio paralelo con una serie de derivados del benceno [1979 BCSJ 2678], en el que se sigue el proceso de complejación con β -CD mediante dicroísmo circular inducido, los complejos presentan una estequiometría 1:1 siendo la anilina y el fenol los que presentan una constante de formación más débil. En todos los casos la orientación de la molécula es paralela al eje de la CD. En un estudio semejante de derivados de ácido 1,4-benceno dicarboxílico y halógeno derivados de benceno [1984 JACS 7607], compuestos todos ellos disustituídos en las posiciones 1 y 4, se forman complejos de estequiometría 2:1 y las mayores constantes de afinidad se observan en el caso del iododerivado y de los sustituyentes de carácter ácido. Asimismo, se observa una correlación inversamente lineal entre los valores de las constantes de afinidad del complejo y el tamaño del halógeno. Los datos espectrofotométricos y de solubilidad permiten analizar y establecer que los valores de las constantes de equilibrio son el resultado de distintas influencias:

- El efecto electrónico del enlace de la CD, según la naturaleza y la posición del sustituyente.
- Un efecto de remplazamiento, que es el resultado del desplazamiento de la primera molécula de CD cuando se enlaza a la segunda molécula de CD.
- La interacción CD-CD para dar lugar a la formación del complejo 2:1.

Las ciclodextrinas muestran una elevada selectividad en la formación de los complejos de inclusión, no sólo con los isómeros de posición sino también con isómeros ópticos por lo que puede afirmarse que presentan estereoselectividad. Así, la formación de complejos con β -CD ha permitido la separación, si bien con una baja eficacia (5%), del (+) mentol y el (-) mentol [1987 TCC 21] [1988 JC 175] (FIGURA 37).

Debowski y col. [1982 JC 303] [1983 JC 83] empleando α - y β -CD como modificadores de fase móvil en cromatografía, logran la resolución de una mezcla racémica de ácido mandélico debido a la distinta afinidad de la CD por los distintos isómeros. De forma análoga se logra la separación de una mezcla racémica de 1-[2-(3-hidroxifenil)-1-feniletil]-4-(3-metil-2-butenil) piperazina [1983 JC 276] o la resolución de los dansil derivados de aminoácidos enantiómeros [1986 JC 409], gracias a la adición de β -CD a la fase móvil y a la formación de los correspondientes complejos de inclusión.

La estereoselectividad en la formación de complejos de inclusión con β -CD, debido a la existencia de interacciones quirales, puede demostrarse tanto mediante espectrofluorimetría, determinando los rendimientos cuánticos, el tiempo de vida y "quenching" de fluorescencia, como por otra serie de estudios fotofísicos [1981 JACS 5480]. Así por ejemplo, se aprecian diferencias muy notables en el proceso de formación de excímeros entre los enantiómeros y la mezcla racémica de metil ésteres derivados de triptófano, aún en soluciones acuosas diluidas [1980 JACS 2923]. La inclusión de los diastereoisómeros (-)- α -(1-naftil) etilamina y (+)- α -(1-naftil) etilamina en α -, β - y γ -CD presenta características muy diferentes. La discriminación de los diastereoisómeros se realiza a la vista de los distintos espectros de emisión en presencia de β -CD, así como por los distintos tiempos de caída de fluorescencia para cada uno de los isómeros después de la formación del complejo [1984 JPC 2167].

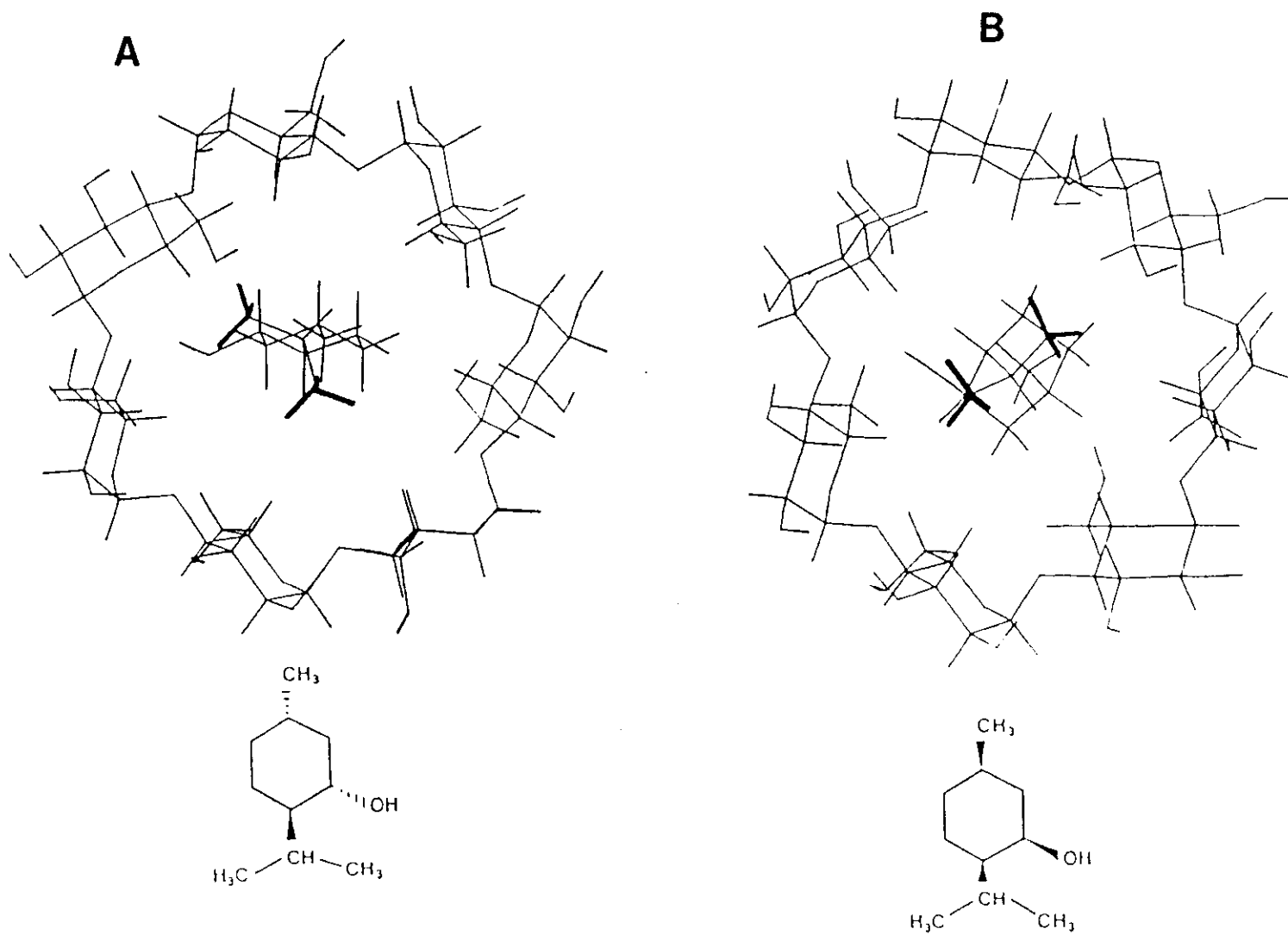


FIGURA 37: Modelos moleculares gráficos de los complejos de inclusión de β -CD con: (A) (+) mentol, (B) (-) mentol.

La estereoselectividad de las CD viene establecida por sus características químicas como se observa con las ciclodextrinas modificadas, que presentan efectos de *enantioselectividad*, según los sustituyentes situados en el grupo hidroxilo del carbono. Ello se demuestra porque las velocidades de hidrólisis para ciertos sustratos varían en presencia de estas CD modificadas [1987 JCSPT 1121]. Por estas razones, las ciclodextrinas pueden emplearse como soportes en las fases estacionarias de las columnas de HPLC o bien como aditivos en la fase móvil, facilitando la separación de isómeros ópticos, geométricos y estructurales [1984 JCSc 441] [1984 JIP 533] [1987 AC 84]. Este punto se comentará más detalladamente en el siguiente apartado.

II.B.3.3.9 APLICACIONES DE LAS CICLODEXTRINAS. UTILIDAD DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION

Son múltiples las aplicaciones que el empleo de ciclodextrinas ha encontrado en la industria química y farmacéutica. La mayoría de ellas van encaminadas hacia la mejora de las características del producto terminado así como al incremento de la estabilidad de los compuestos lábiles. Estas mejoras se consiguen gracias al proceso de inclusión, que puede considerarse como una auténtica encapsulación a nivel molecular del compuesto huésped, protegiéndolo del entorno en que se encuentra. No es nuestro objetivo realizar una revisión pormenorizada de las distintas aplicaciones de estos compuestos; no obstante señalaremos algunas de las que consideramos más significativas.

II.B.3.3.9.1 APLICACIONES FARMACEUTICAS

Tanto en la industria cosmética como en la farmacéutica, la formación de complejos con ciclodextrinas tiene como finalidad la de lograr la mejora de las características del producto terminado, así como la de facilitar la absorción y liberación de principios farmacológicamente activos.

Numerosas sustancias son inestables y sensibles a la acción del O_2 y la incorporación de ciclodextrinas puede incrementar su estabilidad. Sin embargo, ciertos compuestos volátiles como los aceites esenciales, gracias a la formación del complejo con ciclodextrinas, aumentan su resistencia al calor, reduciéndose las pérdidas por volatilización [1979 ACASH 27] [1985 P 697].

La resistencia a la oxidación de la vitamina D se ve notablemente incrementada gracias a la formación de un complejo con β -CD [1980 P 779]. Se ha demostrado que los complejos con ciclodextrinas en solución son más estables que los correspondientes compuestos aislados. En este sentido, el complejo vitamina K₃/ β -CD es mucho más estable frente a la luz en solución ácida o neutra que la propia vitamina K₃ [1982 P 725]. Este incremento en la estabilidad se ha observado para la aspirina [1984 CPB 685], el nitracepam [1982 APCS 80], algunos antiinflamatorios [1975 CPB 1205], el metronidazol [1984 IJP 189], ciertos antibióticos [1986 IJP 161] y otros fármacos.

Asimismo, la formulación de compuestos farmacológicamente activos utilizando ciclodextrinas como vehículos, tiene como consecuencia la mayor hidrosolubilidad de ciertos antiinflamatorios [1975 CPB 1205], el fenobarbital [1981 PAH 204] o la benzotiazida [1984 JPP 621], lo que incrementa de forma muy significativa la biodisponibilidad de estos principios activos. Las prostaglandinas son insolubles e inestables en agua; sin embargo, la formación de complejos de inclusión con α - y β -CD conlleva un efecto de estabilización de estos compuestos, a la vez que una mayor resistencia a la degradación de los mismos en solución [1984 JIP 467].

Algunas ciclodextrinas modificadas (metilciclodextrinas) han demostrado ser útiles en la solubilización de distintas vitaminas liposolubles (A, D, E y K) [1981 LS 307] así como de derivados del ácido retinoico [1983 LS 719].

Dadas las peculiares características de las ciclodextrinas y el importante papel que juegan en la mejora de las propiedades farmacotécnicas de numerosos principios activos, permitiendo la absorción de la forma libre de dichos principios a través de la mucosa intestinal, su estudio es de indudable interés, por lo que se han dedicado numerosas revisiones bibliográficas a este tema [1990 DDIP 91] [1990 DDIP 2221] [1990 DDIP 2487].

II.B.3.3.9.2 APLICACIONES EN CATALISIS QUIMICA

Las ciclodextrinas aceleran numerosas reacciones (oxidaciones, descarboxilaciones, eliminaciones...) [1978 L XLVIII]. La catálisis por ciclodextrinas tiene lugar a través de la formación de un complejo de inclusión con las moléculas implicadas en la reacción. Se

puede afirmar que la velocidad de reacción no aumenta linealmente con la concentración de ciclodextrina aunque existe un óptimo de concentración de ciclodextrina. Además, las reacciones catalizadas por ciclodextrinas muestran características cinéticas semejantes a las reacciones enzimáticas, entre las que se encuentran: saturación, catálisis, estereoespecificidad, formación de un complejo sustrato/catalizador e inhibición competitiva.

Las reacciones catalizadas por ciclodextrinas pueden agruparse en dos categorías:

- Catálisis covalente: estas reacciones transcurren a través de la formación de enlaces covalentes en algún proceso intermedio de la reacción.
- Catálisis no covalente en la cual las ciclodextrinas proporcionan el entorno apolar de su cavidad o un espacio estéricamente restringido en el cual se incorpora un isómero o un conformero estéricamente favorecido. En este caso no se forman enlaces covalentes.

La inclusión de un determinado isómero, así como la aproximación física de los distintos compuestos implicados en la reacción, gracias a la formación de complejos de inclusión, es una de las razones por las que las ciclodextrinas se consideran "sistemas biomiméticos" de forma semejante a los enzimas [1984 CPB 4682]. El incremento en la velocidad de reacción para determinados sustratos que presentan una cierta disposición espacial, es una de las aplicaciones más importantes de las ciclodextrinas en catálisis. De forma análoga, gracias al proceso de inclusión se favorece la formación selectiva de algún producto mayoritario que puede ser estereoespecífico, por lo que se puede favorecer la formación enantioselectiva de algún isómero gracias a la elección de la ciclodextrina adecuada.

Por ejemplo, si se comparan las velocidades y enantioselectividad de β -CD y algunas ciclodextrinas modificadas como dimetil- β -CD y trimetil- β -CD, se puede apreciar que diferentes sustratos tienen preferencia porque determinadas ciclodextrinas catalicen sus reacciones [1981 JACS 154] [1987 JCSPT 1121].

La modificación en la fotorreactividad de distintas moléculas debido a su incorporación a medios organizados (micelas y ciclodextrinas), constituye una de las

parcelas más atractivas de la actividad catalítica de estos medios. La inclusión de las moléculas huéspedes en el interior de la cavidad de las ciclodextrinas, modifica su fotorreactividad de forma imprevisible [1980 ACIEE 344] [1982 S 532]. En ciertos casos las ciclodextrinas protegen a las moléculas incluidas disminuyendo su fotosensibilidad. Así, se ha demostrado que la β -, la γ - y la 2,6-dimetil- β -CD dificultan el proceso de fotodegradación de alcaloides tales como la emetina y la cefalina en solución acuosa, siendo el efecto más significativo en el caso de la dimetil- β -CD [1989 CPB 1591]. Sin embargo en otros casos, las ciclodextrinas catalizan ciertas reacciones fotoquímicas tales como procesos de dimerización e isomerización, gracias a la inclusión de moléculas huéspedes fotosensibles.

La presencia de ciclodextrinas altera el comportamiento del proceso de isomerización *cis-trans* en el caso de los derivados de estilbeno. Se ha observado que la irradiación de estilbeno en benceno conduce de forma mayoritaria al isómero *cis*, mientras que la irradiación de los complejos formados con *cis* o *trans* estilbeno y β -CD en solución acuosa conduce a un equilibrio fotoestacionario, en el que predomina mayoritariamente el isómero *trans* (≈ 70 -80%). Además, la ciclación del *cis* estilbeno a fenantreno sólo tiene lugar en benceno, pero no en presencia de β -CD (FIGURA 38). Sin embargo, otro proceso de isomerización *cis-trans*, como es la irradiación de los ésteres de ácido cinámico, origina una mezcla 1:1 de los isómeros *cis-trans* (FIGURA 39), ya sea en solventes orgánicos o de distinta polaridad como en presencia de β -CD [1986 JP 219].

El proceso de isomerización *cis-trans* del azobenceno se ve también afectado por la formación de complejos de inclusión con α -, β - y γ -CD. La inclusión tiene consecuencias dispares sobre la fotorreactividad de los dos isómeros. El rendimiento cuántico de fotoisomerización para el isómero *cis* no se ve prácticamente afectado con respecto a los valores observados en solventes orgánicos de distinta polaridad y mezclas metanol/agua. Sin embargo, el rendimiento de fotoisomerización para el isómero *trans* disminuye bastante en presencia de ciclodextrina con respecto a las mezclas metanol/agua y se aproxima a los valores obtenidos en solventes orgánicos. Este efecto puede explicarse por la baja polaridad de la cavidad de la ciclodextrina [1987 JPC 5046].

Tanto la β - como la γ -CD aceleran la fotodimerización del 2-antracenosulfonato. Sin embargo, mientras que en solución acuosa o en presencia de γ -CD se obtienen 4 isómeros

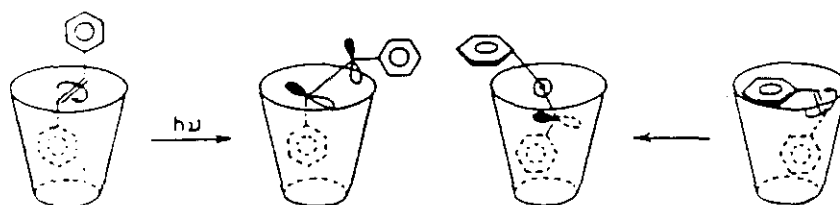
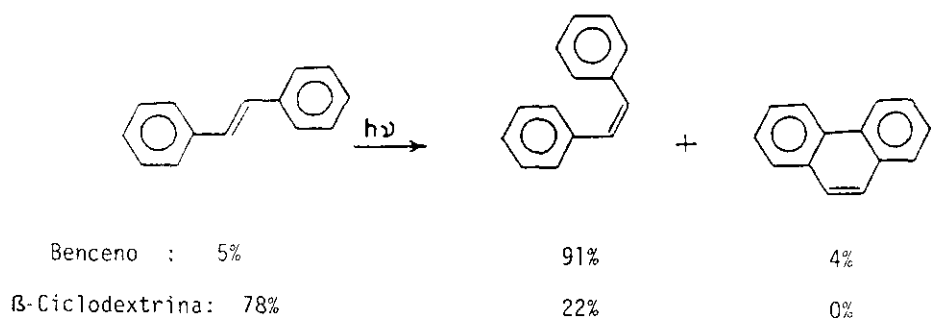


FIGURA 38: *Reacción de fotoisomerización y ciclación del trans-estilbeno. Esquema del modo de isomerización en el seno de ciclodextrinas.*

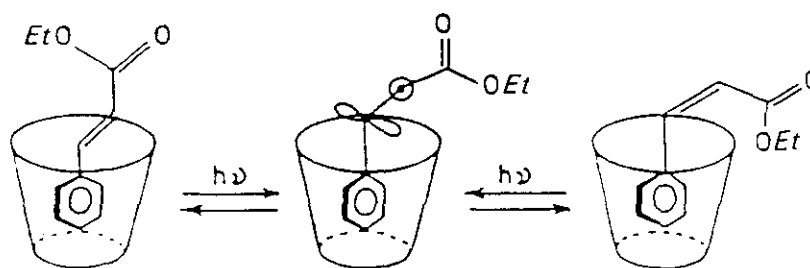
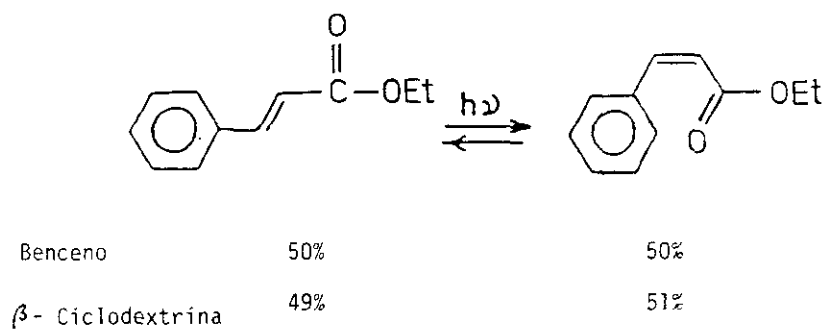


FIGURA 39: *Reacción de fotoisomerización del cinamato de etilo. Esquema del modo de isomerización en el seno de ciclodextrinas.*

con rendimientos cuánticos semejantes, en el caso de la β -CD sólo se obtiene uno de los isómeros, lo que indica que la cavidad de la β -CD fuerza la obtención de una configuración específica [1984 JIP 815].

II.B.3.3.9.3 APLICACIONES ANALITICAS

Las ciclodextrinas han encontrado aplicaciones en campos muy diversos de la química analítica, tanto en técnicas espectroscópicas como en cromatográficas. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas origina un incremento en la selectividad y sensibilidad del método analítico.

La cavidad de las ciclodextrinas posee una alta densidad electrónica, ya que los pares no enlazantes de los oxígenos glicosídicos se orientan hacia el interior de la cavidad, lo que le confiere un carácter de base de Lewis. La elevada densidad electrónica puede contribuir a desplazar los electrones de las moléculas incluidas, lo cual tiene una repercusión significativa sobre los procesos de absorción y emisión de la radiación electromagnética.

Desde el punto de vista de la absorciometría UV-VIS, el proceso de inclusión generalmente conlleva desplazamientos batocrómicos en los máximos de absorción a la vez que variaciones (incremento o descenso) en el valor del coeficiente de absorción molar. Por ello, la complejación con ciclodextrinas de compuestos que se quieren analizar o de reactivos coloreados tiene repercusiones favorables sobre su determinación espectrofotométrica, ya que :

- Incrementa la solubilidad de los reactivos y de los compuestos problema en medios acuosos.
- Aumenta la estabilidad de los reactivos lábiles y de sus complejos coloreados en solución acuosa.
- Eleva la sensibilidad de las reacciones coloreadas si se intensifican las bandas de absorción UV-VIS.

- Mejora la estabilidad de las reacciones coloreadas a través de la especificidad impuesta por la formación del complejo.

La formación de un complejo con β -CD con colorantes básicos tales como verde malaquita, cristal violeta o rodamina B, incrementa la sensibilidad y la estabilidad de los complejos metálicos formados [1992 CR 1457]. Igualmente, la determinación de Cu en cabello humano mediante su reacción con mesotetrakis (4-metoxi-3-sulfofenil) porfirina aumenta su sensibilidad en un 50% en presencia de α -CD. La determinación de Zn con ditizona a través de la formación de un complejo con β -CD incrementa el coeficiente de absorción molar en aproximadamente 8 veces con respecto a las soluciones sin β -CD. La β -CD incrementa la sensibilidad, en la determinación de paladio con 1,2-diamino antraquinona [1987 MA 217].

Las técnicas de luminiscencia, en sus vertientes fluorimetría y fosforimetría han alcanzado un rápido desarrollo en análisis de rutina, gracias a los bajos límites de detección obtenidos y a su gran selectividad con respecto a la absorciometría UV-VIS. Sin embargo, muchos compuestos luminescen muy débilmente en solución acuosa y la adición de ciclodextrinas conlleva una notable mejora en los procesos de emisión, debido entre otras las siguientes razones:

- La disposición estructural de las ciclodextrinas protege a los estados excitados (singulete o triplete) de los posibles amortiguadores presentes en la solución.
- La rotación de las moléculas está impedida debido a la formación del complejo de inclusión y al mismo tiempo se impiden los procesos de relajación en los que intervienen las moléculas del solvente. En cualquier caso, el resultado es un descenso en los procesos de relajación vibracional.
- La cavidad de las ciclodextrinas proporciona un entorno de polaridad semejante a la de un solvente orgánico. Se considera que la polaridad de este microentorno es semejante a la de los solventes orgánicos oxigenados tales como: dioxano, alcohol *terc*-amílico o 1-octanol [1976 JB 393] [1987 JLC 665].

- Las ciclodextrinas mejoran los límites de detección de los compuestos que se van a analizar debido a que incrementan la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en medios acuosos.

La formación de complejos de inclusión incrementa asimismo el rendimiento cuántico de fluorescencia y por consiguiente las intensidades de fluorescencia de numerosos compuestos, entre otros de pireno [1985 JACS 4655], alucinógenos [1985 ACA 355], narcóticos [1985 ACA 3], bifenilos policlorados [1985 EST 155] o ANS [1967 JACS 14], incrementándose las señales de fluorescencia en aproximadamente diez veces.

La sensibilidad para ciertas reacciones analíticas, aumenta gracias a la adición de ciclodextrinas. Por ejemplo, la emisión de glutation y otros derivados tiólicos que reaccionan con el 7-fluorobenceno-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonato amónico, así como la determinación de aminoácidos por reacción con el cloruro de dansilo, se incrementa aproximadamente en ocho veces con respecto a la alcanzada en soluciones acuosas [1990 A 359]. También se ha demostrado la mejora de la sensibilidad en la determinación analítica de escandio con quinizarina (1,4-dihidroxi-antraquinona) a través de la formación de un complejo con β -CD [1987 A 1037].

Las ciclodextrinas incrementan asimismo la intensidad de emisión de las reacciones quimioluminiscentes [1986 CL 377] [1987 JL 19]. Esta mejora puede atribuirse a distintos factores, entre los que se encuentran un aumento de la velocidad de la reacción y una mayor eficacia del proceso de excitación y protección de las especies emisoras de los fenómenos de "quenching".

En la mayoría de los casos la presencia de ciclodextrinas contribuye a mejorar la emisión fluorescente. Sin embargo, algunas ciclodextrinas pueden amortiguar selectivamente la emisión de ciertos cromóforos si el compuesto amortiguado se incluye en la misma cavidad que el analito problema [1983 JPC 1833]. En un estudio sobre derivados de cumarinas se pone de manifiesto que la β -CD mejora la emisión fluorescente de la 7-hidroxycumarina pero amortigua la de la 7-hidroxi-4-metil cumarina.

Una de las aplicaciones más relevantes de las ciclodextrinas es la de permitir la observación de la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP). Ello es debido a que protegen el estado triplete excitado de las moléculas de los amortiguadores presentes en la solución y en el caso de la fosforescencia, del "quenching" del oxígeno molecular. Consecuentemente, se puede detectar la fosforescencia del naftaleno, bromonaftaleno, acenafteno, fenantreno, pireno y criseno entre otros [1984 AC 322]. También se ha descrito la emisión de fosforescencia (RTP) para ciertos heterociclos como quinolina e isoquinolina [1984 AC 331].

Las ciclodextrinas se utilizan también en la detección luminiscente de compuestos volátiles. El papel de filtro tratado con ciclodextrinas es capaz de capturar de forma eficaz compuestos volátiles tales como 1- y 2-naftol, permitiendo la observación de la fosforescencia de los mismos [1989 JM 317]. Asimismo, las mezclas β -CD/NaCl (30:70) originan señales muy intensas de los compuestos que se van a determinar, sin necesidad de utilizar como recurso el efecto de átomo pesado para mejorar el proceso de fosforescencia. Esta metodología permite la determinación de ácido p-aminobenzoico y fenantreno [1989 AC 2463]. Las mezclas de α -CD/NaCl, se han utilizado en la detección mediante RTP, de distintos compuestos adsorbidos en estas matrices sólidas entre otros 4-fenilfenol [1988 AS 619] o fenantreno [1989 AS 810].

Las ciclodextrinas se utilizan como reactivos quirales en RMN. En muchos casos, la formación de complejos de inclusión modifica las características quirales y los desplazamientos químicos de dos enantiómeros [1975 TL 3325]. La diferencia en los desplazamientos químicos de dos diastereoisómeros puede utilizarse para la determinación de la pureza de las muestras. La intensidad de las señales de cada diastereoisómero se ha empleado para determinar su pureza óptica [1987 MRC 208]. Así pues, el estudio por ^{19}F -RMN de los complejos formados con diastereoisómeros de aminoácidos fluorados y α -CD muestra que los desplazamientos químicos de los derivados formados con isómeros R aparecen a campos más altos que los correspondientes isómeros S, para N-(p-fluorobenzoil) valina, y α -(p-fluorofenil) glicina entre otros [1991 JCSFT 2699].

La formación de complejos de inclusión puede modificar de forma muy significativa las características redox de las moléculas incluidas. En un estudio electroquímico sobre diversos derivados de p-hidroxibenzoatos se observa que la presencia de β -CD implica un

descenso en la altura del pico a la vez que un desplazamiento hacia potenciales más negativos en el valor del potencial de semionda [1986 IJP 105]. Si bien estas variaciones son útiles para demostrar la inclusión y calcular las constantes de formación del complejo, son relativamente pocos los estudios sobre las aplicaciones analíticas en electroquímica de las ciclodextrinas.

Matsue y col. [1986 AC 2096] han descrito un electrodo regioselectivo basado en un sistema de electrodo recubierto con poli-(ácido perfluorosulfónico)-ciclodextrina, capaz de complejar el *o*-nitrofenol en presencia de *p*-nitrofenol. El sistema es unas treinta y tres veces más sensible para el *o*-derivado que para el *p*-nitrofenol.

Nagase y col. [1990 AC 1252] han desarrollado sensores voltamétricos capaces de responder a compuestos aniónicos. Estos sensores están contruidos con una membrana que contiene un polímero poliaminado de ciclodextrina, el cual se deposita directamente sobre un electrodo de carbono vitrificado, respondiendo selectivamente a los compuestos aniónicos entre los que se encuentran los isómeros de posición de *m*-isofталato, *p*-tereftalato y *o*-ftalato.

Las ciclodextrinas incrementan la selectividad de las separaciones cromatográficas debido a que el proceso de partición es más selectivo que el que se produce entre el eluyente y la fase estacionaria por sí sola. Hinze [1981 JLC 1065] ha descrito la separación de fenoles, naftoles y derivados de ácido benzoico, adicionando α -CD a la fase móvil. En general, los factores de retardo R_f son: R_f *p*-isómeros > R_f *m*-isómeros > R_f *o*-isómeros. La β -CD es una de las más utilizadas por el tamaño de su cavidad; sin embargo tiene como inconveniente su baja solubilidad en H₂O. Algunos polímeros más hidrosolubles de β -CD se han utilizado para mejorar las separaciones de barbitúricos [1986 JC 356], derivados de trifenil metano [1984 JIP 395], derivados de nitroestireno [1986 JIP 55] y diversos aminoácidos y alcaloides [1990 JPIC 65] por TLC.

En HPLC, la aplicación de las ciclodextrinas ha alcanzado un éxito espectacular. Se pueden encontrar incorporadas como soportes a las fases estacionarias, resinas que contienen ciclodextrinas como por ejemplo la CD-poliuretano o las de CD-polivinil alcohol, que se han utilizado en la separación de aminoácidos [1979 ACASH 265] [1981 JC 35] y alcaloides [1981 JC 109]. Posteriormente se han desarrollado fases estacionarias

de ciclodextrinas enlazadas a sílice [1984 JLC 1273] que proporcionan una muy buena resolución en la separación de isómeros.

Otra de las aplicaciones de las ciclodextrinas en HPLC es su incorporación a la fase móvil para mejorar las separaciones, dado que las ciclodextrinas poseen las siguientes características:

- Proporcionan una complejación reversible y selectiva.
- Son solubles en agua.
- Son estables y no muestran absorción en la región UV-VIS del espectro electromagnético.

Estas características hacen que por regla general las ciclodextrinas se utilicen en procesos de separación en fase inversa, logrando la separación de isómeros, diastereoisómeros y enantiómeros. La elevada resolución que se obtiene se debe a las diferencias en las constantes de estabilidad de los complejos en la fase móvil y a la diferente adsorción de estos complejos sobre la fase estacionaria [1992 CR 1457]. Por ello las ciclodextrinas se han empleado con buenos resultados en la separación de compuestos quirales, entre otros barbitúricos y mefenitoina [1989 L LIII], fenilalanina [1982 JC 303], α -pireno [1991 JHRC 361], pseudoefedrina [1988 AC 2751], *o*-, *m*-, *p*-nitroanilina [1991 AC 1902], trimeprazina [1990 JPBA 847], esteroides [1991 JLC 2109], ácidos biliares y sus correspondientes derivados fluorescentes [1991 JC 111] [1991 JLC 605] y aminoácidos dansilados [1986 JC 409], entre otros ejemplos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.A MATERIAL Y METODOS

III.A.1 APARATOS Y REACTIVOS

III.A.1.1 APARATOS

Para la obtención de los espectros de absorción UV-VIS se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Kontron modelo Uvikon 810, provisto de una lámpara halógena de cuarzo con un intervalo de emisión de radiaciones de longitudes de onda comprendido entre 290-900 nm y de una lámpara de deuterio que cubre un intervalo comprendido entre 195-370 nm, disponiendo de monocromador de red de difracción de 1500 líneas/mm y como detector un fotomultiplicador modelo R446. El intervalo de longitudes de onda de trabajo se encuentra comprendido entre 200 y 800 nm y la anchura de rendija utilizada, expresada en términos de paso de banda nominal es de 2 nm. Para registrar los espectros se utilizó un "printer-plotter" de Kontron, modelo P-800, con un sistema de registro de cabeza de impresión térmica. Se emplearon cubetas de cuarzo de paso óptico 1 cm.

Para llevar a cabo los espectros de fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-3, con monocromadores de excitación y de emisión del tipo F/3 Monk-Gillieson. La lámpara (fuente de radiación) es de descarga de xenon de 150 W de tipo pulsante. El intervalo de longitudes de onda de excitación está comprendido entre 230 y 720 nm, mientras que el de longitudes de onda de emisión lo es entre 250 y 800 nm. La anchura de rendija, tanto de excitación como de emisión, es fija de 10 nm. Como detector utiliza un fotomultiplicador con respuesta S5 y cubierta estándar de vidrio UV. También se realizaron algunas determinaciones se realizaron con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo MPF-2A.

Los espectros de absorción IR se realizaron con un espectrofotómetro IR Buck Instruments modelo 500, con las muestras sólidas en forma de comprimidos de bromuro potásico.

Los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron en un espectrofotómetro Bruker AC-250 (250 MHz). Los complejos y la β -CD pura se disolvieron en D_2O y los retinoides en CDCl_3 .

utilizándose DSS (4,4-dimetil-4-silapentano-5-sulfonato sódico) y TMS (tetrametilsilano) respectivamente como patrones internos. En la obtención de los espectros de RMN de ^{13}C se utilizó un espectrofotómetro Varian modelo VXR-300 (300 MHz) y en este caso los complejos fueron disueltos en DMSO- d_6 . Ambos espectrofotómetros proporcionan el interferograma del compuesto, que es procesado por ordenador y mediante transformada de Fourier da lugar al correspondiente espectro.

Para la obtención de las curvas por termogravimetría y por termogravimetría diferencial se utilizó una termobalanza Metler modelo TA 3000 DS 20.

Para los ensayos que requirieron una agitación magnética se utilizó un multiagitador magnético SBS modelo A-04 de la serie C, sobre el que se dispuso una cubeta de metacrilato que se utilizó como baño termostatzado gracias a que se introdujo en su interior una espiral de cobre por la que circula agua que proviene de un baño termostatzado Hetofrig. Se empleó este sistema con la finalidad de mantener las muestras a una temperatura de 10 o 20°C.

Para las determinaciones en cromatografía líquida de alta eficacia, se utilizó una bomba Kontron LC-Pump T-414 con un inyector Rheodyne 7125 de capacidad de carga de 20 μL . El tipo de columna empleado para la cromatografía en fase normal fue Lichrosorb Si 60 de tamaño de partícula 5 μm y de dimensiones 15x0'4 cm. Para la cromatografía en fase inversa se utilizó una columna de tipo C₁₈ Spherisorb ODS-2 de 3 μm de tamaño de partícula y de dimensiones 15x0'4 cm. El detector usado fue un Varian de longitud de onda variable modelo UV-50, de tipo espectrofotómetro ultravioleta-visible, con un intervalo de longitudes de onda de trabajo comprendido entre 200 y 900 nm. Normalmente se utilizó un paso de banda de 16 nm.

En los ensayos que requirieron irradiación, se utilizó una lámpara Desaga de baja presión de descarga de gases de 150 watios con un máximo de emisión a 366 nm que proporciona radiaciones pertenecientes a la región visible y UV cercano del espectro.

III.A.1.2 REACTIVOS

Los disolventes utilizados (hexano, etanol) fueron de calidad para espectroscopia en el caso de las soluciones empleadas para la obtención de los espectros de absorción y fluorescencia o de calidad para HPLC, en el caso de las soluciones estudiadas por cromatografía (HPLC): hexano, etanol, eter etílico, acetonitrilo, isopropanol, metanol, tetrahidrofurano (THF).

Los retinoides estudiados fueron los siguientes: todo-*trans* retinal y los isómeros 9-*cis* y 13-*cis*, suministrados por la casa Sigma, mientras que el retinol, el acetato de retinilo y el ácido retinoico fueron de Fluka.

Las diversas ciclodextrinas, tanto sencillas como modificadas que se emplearon en el presente trabajo fueron las siguientes: α -ciclodextrina (α -CD), β -ciclodextrina (β -CD), hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β -CD) y la γ -ciclodextrina (γ -CD) que fueron generosamente cedidas por los laboratorios Rhône-Poulenc (Francia), mientras que la 2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina (DM β -CD) y la 2,3,6-tri-O-metil- β -ciclodextrina (TM β -CD) fueron suministradas por Sigma.

Se prepararon soluciones acuosas micelares de los siguientes tensoactivos: SDS (dodecilsulfato sódico), CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio), Triton X-100 (isooctilfenil éter de polioxietileno) y Brij-35 (23 lauril éter de polioxietileno). La concentración final de dichas soluciones fue doce veces la concentración crítica micelar (CMC). SDS: CMC = 8.1×10^{-3} M, CTAB: CMC = 9.2×10^{-4} M, Triton X-100 (TX-100): CMC = 3×10^{-4} M, Brij-35: CMC = 9×10^{-5} M. Las soluciones se desgasificaron por "sonicación" y se prepararon 24 horas antes de su utilización.

El agua utilizada para preparar las soluciones micelares y de ciclodextrina fue agua destilada y desionizada y para los ensayos encaminados a la obtención de los espectros de RMN se utilizó agua deuterada y DMSO- d_6 de Sigma, al igual que los patrones de DSS y TMS.

III.A.2 METODOLOGÍA

III.A.2.1 FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION

La metodología empleada en la formación de los complejos de inclusión es de una importancia capital con respecto a los resultados que se obtienen posteriormente. Por ello, es fundamental hacer hincapié en este proceso y conseguir su optimización. Si la inclusión en la ciclodextrina entraña dificultad en sí misma, en el caso que nos ocupa y debido a las características peculiares de los retinoides (son especialmente sensibles a ciertos factores externos tales como la luz y el oxígeno, hay que manejarlos con gran precaución y presentan una solubilidad en agua extremadamente baja) la formación de un complejo de inclusión con ciclodextrinas presenta una dificultad extrema. Por todas estas razones se ensayó el proceso de inclusión de distintas maneras, algunas de ellas elegidas a la vista de las descripciones de la bibliografía y otras deducidas en función de nuestra propia experiencia. A continuación vamos a exponer de forma detallada los distintos métodos empleados para la preparación de los complejos.

METODO 1 (clásico)

La técnica de preparación del complejo de inclusión que se describe a continuación fue la que se utilizó de forma sistemática para la obtención de los complejos de inclusión, la determinación de características espectrofotométricas y espectrofluorimétricas, los ensayos de irradiación así como los ensayos cuantitativos y de cálculo de las constantes de asociación y la estequiometría de los complejos. Dado que no siempre se obtuvieron resultados reproducibles, posteriormente se utilizaron los otros métodos alternativos.

En primer lugar se tomaron unos microlitros (10 ó 20 μL) de la solución madre de retinoide (etanólica o en hexano) a los que se añadieron 6 mL de hexano en un matraz de fondo redondo de 100 mL. La mezcla se sometió a agitación mecánica, mientras se evaporaba el hexano con la ayuda de una bomba de vacío. Una vez completada la evaporación del disolvente, sobre las paredes del matraz se extiende una fina película del retinoide. A este matraz se le añadieron entonces 10 mL de una solución de ciclodextrina de la concentración deseada preparada con anterioridad. El conjunto se puso en un baño de agua a una temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ aunque en algunos casos se aumentó la

temperatura hasta $20 \pm 1^\circ\text{C}$ (esto se hizo cuando se utilizaron concentraciones de ciclodextrina que estaban muy próximas a su límite de solubilidad a temperaturas más bajas). El conjunto se sometió a agitación magnética en la oscuridad durante 24 horas.

METODO 2 (complejo sólido)

Se pensó en la formación de un complejo sólido, tal y como se describe en la bibliografía para una molécula de estructura bastante parecida a la de los retinoides, como es el difenil hexatrieno (DPH) [1991 L LIV], para lo cual se pesó una cantidad de retinal y asimismo una cantidad de ciclodextrina según las concentraciones relativas que queramos obtener de cada uno de los compuestos en la solución final. Ambos productos sólidos se pusieron en un mortero y se interpusieron con la ayuda del pistilo hasta la obtención de un fino polvo amarillo totalmente homogéneo. La formación del complejo estaría favorecida por la energía mecánica suministrada mediante la agitación manual, aunque también puede ocurrir que únicamente se obtenga una mezcla física de ambas moléculas. Finalmente se añadió el agua necesaria para formar la solución, que se sometió a agitación magnética durante 24 horas.

METODO 3 (gota de cloroformo)

En primer lugar se preparó la solución de ciclodextrina de la concentración deseada y se vertió sobre el matraz de fondo redondo. Por otro lado se preparó una solución de retinoide en cloroformo. Se utiliza este disolvente ya que reúne dos condiciones interesantes: en primer lugar no es miscible con el agua y debido a su tensión superficial, si se deja caer sobre la superficie acuosa tenderá a extenderse de manera uniforme ocupando la totalidad de la superficie. En segundo lugar el cloroformo se evapora fácilmente por lo cual dejará libres rápidamente a las moléculas de retinoide, que quedarán dispuestas para incluirse en el interior de las moléculas de ciclodextrina.

Por otro lado se tuvo en cuenta la siguiente consideración: se calculó la concentración de la solución del retinoide en cloroformo, de tal manera que si se toman 10 μL de la solución clorofórmica y se dejan caer sobre la superficie acuosa y si suponemos que estos 10 μL se van a extender por toda la superficie de agua, cada molécula de retinoide se encontrará separada físicamente de las otras, pudiendo por tanto acceder al

interior de la ciclodextrina con más facilidad. Una vez que se hubo evaporado el cloroformo, la solución se sometió como siempre a agitación magnética.

METODO 4 (desplazamiento)

Dado que una de las fuerzas conductoras en la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas es el cambio energético favorable que tiene lugar cuando las moléculas de agua alojadas en el interior de la cavidad son desplazadas por una molécula de mayor hidrofobicidad, en este método se utilizó una molécula capaz de desplazar el agua que hay en el interior de la ciclodextrina, es decir en una molécula de la que se tenga conocimiento de que es capaz de formar un complejo de inclusión con ciclodextrinas [1979 BCSJ 2678] [1981 BCSJ 513].

De acuerdo con esto, en primer lugar se intentó formar un complejo de inclusión con el benceno, molécula que posee las siguientes características: por un lado es más pequeña que la molécula de retinal y por lo tanto debe poder incorporarse más fácilmente al interior de la ciclodextrina al haber un menor impedimento estérico. Por otro lado, al ser más hidrófoba que el agua, el retinal deberá ser capaz de desplazar más fácilmente al benceno del interior de la ciclodextrina.

Por lo tanto se siguió el método clásico para la formación del complejo de inclusión retinal/benceno. En otro matraz se evaporó el hexano de una solución de retinoide como se hace habitualmente. Una vez hecho esto, se añadió al matraz que contenía el retinoide la solución del complejo benceno/ciclodextrina y se sometió a agitación magnética.

METODO 5 (formación de un complejo ternario)

Se comenzó por intentar formar un complejo ternario entre el retinoide, la ciclodextrina y una tercera molécula, el *terc*-butanol. Ueno y col. [1981 JCSCC 194] ya habían demostrado que la incorporación de los alcoholes facilita el equilibrio de complejación por la ciclodextrina. Entre los alcoholes por ellos estudiados el *terc*-butanol puede ser el que ejerza una influencia más significativa. En esta línea, se intentó la formación de un complejo ternario entre el retinal, la ciclodextrina y el *terc*-butanol. Estos

mismos autores también habían sugerido que el alcohol puede actuar de dos maneras diferentes:

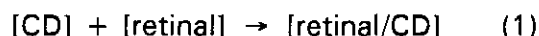
- El *terc*-butanol podría entrar en el interior de la cavidad de la ciclodextrina junto con la molécula que se quiere incluir, impidiendo de este modo que se produzcan rotaciones dentro de la misma y estabilizando por tanto el complejo. Así se aseguraría en nuestro caso una unión más fuerte entre el retinoide y la ciclodextrina y en el caso de los compuestos fluorescentes se consiguen minimizar las desactivaciones por otras vías distintas de la emisión de luminiscencia.
- Otra posibilidad de actuación que se sugiere es que el *terc*-butanol, en lugar de entrar en interior de la ciclodextrina se una a ella por el exterior, consiguiendo que de alguna manera la estructura de tronco de cono de la ciclodextrina quede más alargada. De este modo se aseguraría una mejor protección de la molécula de retinoide, una vez que se halle en el interior del conjunto ciclodextrina/*terc*-butanol.

Se han descrito dos modos diferentes de preparar este complejo ternario [1988 JÍP 277]. Nosotros ensayamos las dos maneras. En la primera se preparó una solución madre de retinal en *terc*-butanol o bien se partió de la madre en hexano (tomando la cantidad habitual, esto es 10 ó 20 μ L de la misma), se evaporó el mismo y añadió una cantidad fija de *terc*-butanol del 10%, es decir 1 mL para 10 mL de solución final. Se disolvió el retinal en el *terc*-butanol mediante agitación magnética durante dos horas, añadiéndose 1 mL de solución madre de ciclodextrina y finalmente se enrasó hasta 10 mL con agua destilada, obteniéndose de este modo las concentraciones finales deseadas de ciclodextrina, retinal y *terc*-butanol. El conjunto se sometió a agitación magnética durante 24 horas.

La otra manera de preparar el complejo ternario fue la siguiente: se preparó la solución de retinal en la ciclodextrina del modo habitual y después de 24 horas de agitación se añadió el volumen deseado de *terc*-butanol (1 mL). El conjunto se puso también en agitación durante 24 horas y se comprobó que no había variaciones significativas con respecto al método anterior.

METODO 6 (sobresaturación)

Se preparó una solución de retinoide en ciclodextrina por el método clásico manteniéndose durante algunas horas en agitación. Se partió de la concentración inicial de ciclodextrina que es habitual. En la solución se producirá el siguiente equilibrio:



Si suponemos que el complejo retinal/ciclodextrina es más insoluble que la propia ciclodextrina, si a esta disolución le vamos añadiendo lentamente cantidades crecientes de ciclodextrina, cuando se aumente la concentración de ciclodextrina el equilibrio se desplazará hacia la derecha y el complejo tenderá a precipitar, al ser el componente más insoluble. Si se consigue recoger el precipitado (que debería ser el complejo sólido, susceptible de ser aislado e identificado) y luego se vuelve a disolver en agua, tendremos una solución con el complejo.

Otra variación de este método en la que se pensó fue la siguiente: para conseguir desplazar el equilibrio de la ecuación (1) hacia la derecha, en vez de añadir cantidades crecientes de ciclodextrina se puede pensar en añadir cantidades crecientes de retinal hasta que se forme el precipitado del complejo. El problema que puede plantearse aquí es que en el caso anterior hemos considerado que el complejo es más insoluble que la propia ciclodextrina mientras que en el caso del retinal se puede pensar que es más probable que ocurra lo contrario (que el retinal sea más insoluble que el complejo). Por este motivo finalmente no se intentó formar el complejo mediante este procedimiento. Además en el primer caso la ciclodextrina libre quedaría en solución solubilizada, mientras que en el segundo el exceso de retinal tendería a precipitar. Por tanto sería necesario lavar el complejo con un solvente orgánico para eliminar el retinal en exceso. La presencia de este disolvente podría disociar el complejo.

METODO 7 (complejo sólido formado en agua deuterada)

Para la obtención de los espectros de ^1H -RMN, se procedió a preparar los complejos con concentraciones de retinoide de 2×10^{-3} M y 4×10^{-3} M, siendo la concentración de β -CD 1×10^{-2} M. Se siguió el procedimiento habitual: disolución en hexano

o una mezcla hexano/etanol y evaporación a vacío a temperatura ambiente. Una vez formada la película se procedió a la adición de una cantidad apropiada (5 mL) de solución de β -CD preparada en agua deuterada y se mantuvo la agitación durante 24 horas. Para el retinal, además de las soluciones anteriormente citadas se prepararon igualmente otras de concentraciones 5×10^{-3} M, 6×10^{-3} M y 8×10^{-3} M.

Tras las 24 horas de agitación se observó la formación del complejo, el cual permanece en solución y coexiste con un precipitado muy fino también identificado como complejo retinal/CD. Se procedió a filtrar estas soluciones con el fin de evitar las partículas sólidas en suspensión. La filtración se llevó a cabo empleando celite^R.

Dado que en el filtro se aprecia ostensiblemente que queda retenida una gran cantidad de producto, se pensó que se trataba de retinal insolubilizado, por lo que se realizó un espectro de ^1H -RMN en DMSO- d_6 (dimetilsulfóxido deuterado), el cual pone de manifiesto que se trata del complejo retinal/CD al hallarse los picos de absorción de la ciclodextrina y no del retinal. En consecuencia, dado el intenso color amarillo del finísimo precipitado y descartada la posibilidad de que se tratase del retinal insolubilizado, se procedió a aislar el complejo sólido.

En primer lugar, las soluciones que contienen el complejo sólido en suspensión se colocaron en tubos de centrífuga y con la ayuda de una pipeta Pasteur se recogió la solución, dejando reducido el volumen de agua al mínimo necesario para conseguir el equilibrio de peso entre los tubos. A continuación se centrifugaron estas muestras a 2000 rpm; con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró el sobrenadante y el finísimo precipitado se trasvasó a un recipiente adecuado, tras lo cual se procedió a la liofilización del complejo para eliminar todo resto de agua.

Después de la liofilización se obtiene una masa de aspecto esponjoso y de color verde amarillento, que se sella herméticamente y se conserva en desecador. Dado que los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, confirman la existencia de un complejo de una forma más clara para el caso de la muestra preparada con una concentración de retinal 4×10^{-3} M, se decidió realizar una serie de pruebas analíticas para esclarecer la identidad de dicho complejo.

Es probable que en este caso se obtenga el complejo sólido, primero porque la concentración de retinal es más elevada de lo habitual y segundo porque los complejos de ciclodextrina son más insolubles en agua deuterada [1982 L XXXIV].

Una vez que se hubo aislado el complejo sólido tal y como se ha descrito se realizó un espectro de absorción UV-VIS, preparando para ello una solución acuosa del complejo de concentración 1 mg/10 mL, con la finalidad de ver si existían diferencias entre los espectros de absorción de los complejos de inclusión preparados por el método clásico con respecto al complejo sólido formado en agua deuterada.

III.A.2.2 SEGUIMIENTO DE LA FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION

III.A.2.2.1 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION UV-VIS

Para obtener los espectros de absorción de los distintos retinoides, se partió de soluciones madre, en hexano o en etanol, de concentración 5×10^{-3} M, preparándose a partir de éstas mediante dilución las correspondientes soluciones etanólicas hasta la obtención de una concentración final de 1×10^{-5} M. Los barridos espectrales se realizaron en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 200 y 500 nm. Normalmente los valores de absorbancia que se obtienen con estas concentraciones están comprendidos entre 0'3 y 0'5 para las soluciones preparadas en solventes orgánicos, obteniéndose valores más bajos y más variables en el caso de las soluciones acuosas de ciclodextrina.

Una vez preparados los complejos, se estudió la evolución de los mismos por espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible. Así pues, se registró el espectro de absorción entre 200 y 500 nm, las mismas longitudes de onda que se usaron para las soluciones disueltas en hexano o en etanol. Como blanco se utilizó agua, ya que las ciclodextrinas sólo empiezan a absorber de forma significativa a concentraciones bastante elevadas, del orden de 5×10^{-2} M, y por debajo de 300 nm. Se observó que en el caso concreto de la β -CD, la aparición del máximo a 280 nm se veía acentuada cuando se preparaban soluciones de concentración 1×10^{-2} M, prácticamente en el límite de solubilidad de la β -CD. Este hecho se comentará posteriormente.

En estos espectros los valores de absorbancia disminuyen claramente con respecto a las soluciones de los mismos compuestos en disolventes orgánicos. Por regla general se puede decir que los valores en el máximo de absorción suelen variar entre 0'2 y 0'4 unidades de absorbancia, aunque en los casos en los que la formación del complejo no ha sido satisfactoria suelen ser claramente menores. Por lo tanto cuando estos valores disminuyen mucho se puede pensar que no se ha formado apreciablemente el complejo en la solución.

Este hecho puede comprobarse simplemente de forma visual en el caso del retinal debido a su coloración amarilla, pudiéndose observar como los cristales del mismo se han quedado adheridos a las paredes del matraz. En segundo lugar, se realiza una comprobación más sistemática, recogiendo el producto adherido con un disolvente como el etanol (por si quedara algún resto de agua). Al hacer el espectro de absorción, se obtiene el perfil correspondiente al retinoide en el solvente orgánico y con valores de absorbancia que son más elevados cuanto menor es la absorbancia del complejo, lo cual indica que una menor cantidad de retinoide se ha incluido en la ciclodextrina.

El perfil de los espectros de absorción de los retinoides en solución de ciclodextrina puede parecerse en mayor o menor medida al de los espectros obtenidos para los mismos compuestos en el seno de solventes orgánicos. Sin embargo, en general las bandas de absorción son bastante más anchas y suelen presentar un desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda más largas. Probablemente este hecho se deba únicamente al cambio en la polaridad del disolvente. En el caso del retinal, que presenta un máximo de absorción de 368 nm en hexano, se produce un desplazamiento cuando se encuentra en la solución de ciclodextrina situándose entonces entre 380 y 385 nm, longitud de onda que corresponde aproximadamente al máximo de absorción del retinal en etanol.

En algunos casos aparecen nuevas bandas de absorción, como ocurre cuando se forma un complejo de inclusión entre el acetato de retinilo y la HP β -CD, cuyo espectro difiere bastante del que se obtiene en hexano o etanol. Finalmente cabe señalar que en muchos casos, las soluciones de ciclodextrina presentan un máximo claro a 280-290 nm, que en algunas ocasiones es de poca intensidad, pero que en otras muestra un valor de absorbancia que incluso puede superar a la del máximo a 380 nm. La posible explicación de este hecho está relacionada en algunos casos con concentraciones muy elevadas de β -

CD, aunque no siempre se puede asociar la aparición de este pico con una concentración de ciclodextrina de 10^{-2} M.

A partir de los espectros de absorción se procedió a hacer el cálculo de las constantes de asociación de la β -CD y la HP β -CD con los distintos retinoides objeto de estudio, así como la estequiometría de los complejos.

III.A.2.2.2 ESPECTROFLUORIMETRIA

Una vez realizados los espectros de absorción ultravioleta-visible se llevaron a cabo los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia de las soluciones, determinándose los máximos de excitación y emisión para cada uno de los compuestos. Estos máximos no están corregidos por lo que no siempre existe una identificación total entre los perfiles de absorción y los de excitación.

Como ya se ha comentado en la parte teórica, en condiciones normales solamente el retinol y el acetato de retinilo van a presentar fluorescencia a temperatura ambiente. Sin embargo, con las soluciones de ciclodextrina se intentó por un lado conseguir ver fluorescencia a temperatura ambiente de otros retinoides tales como el retinal y el ácido retinoico y por otro conseguir un aumento de la fluorescencia en medio acuoso de los retinoides que fluorescen en solventes orgánicos pero no en agua debido a su baja solubilidad.

III.A.2.2.3 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN)

Para el retinal, además de las soluciones de concentración 2×10^{-3} M y 4×10^{-3} M anteriormente citadas, se prepararon igualmente otras de concentración 5×10^{-3} M, 6×10^{-3} M y 8×10^{-3} M. Una vez completada la agitación se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN. Previamente se obtuvieron los espectros de ^1H -RMN de los productos puros en cloroformo deuterado. Se empleó TMS como patrón interno para la obtención de los espectros en cloroformo deuterado y DSS para la obtención de dichos espectros en D_2O .

Una vez que se obtuvo el complejo en agua deuterada, se realizaron los espectros de absorción UV-VIS y los de resonancia protónica de las soluciones filtradas. Igualmente

se registraron dichos espectros para las soluciones no filtradas, no apreciándose variaciones en el valor del desplazamiento químico como consecuencia de la filtración. El espectro de ^1H -RMN reveló la existencia del complejo retinal/CD.

Dicha existencia se pone de manifiesto por las variaciones en la aparición de los picos de absorción y desplazamiento químico de los protones de la ciclodextrina como consecuencia de la inclusión. Las modificaciones en los valores de las constantes de acoplamiento (J) también revelan la existencia de un complejo debido a que se deforma la cavidad de la ciclodextrina como consecuencia de la inclusión.

III.A.2.2.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION IR

Se realizaron los espectros de absorción IR interponiendo el complejo sólido en KBr. Para ello se pesó una cantidad de complejo apropiada, de tal forma que la concentración de retinal en el complejo interpuesto con el KBr resultase ser aproximadamente del 2%. Paralelamente se realizaron los espectros de absorción IR del retinal (2% p/p) interpuesto en KBr y de una mezcla física de retinal y β -CD preparada en la misma proporción en peso que lo que debería encontrarse en el complejo, y se interpuso KBr de tal forma que la concentración final de retinal fuese del 2% (p/p). La existencia del complejo se verifica si se producen variaciones en la posición o bien desaparición de las bandas de absorción IR correspondientes a determinados cromóforos de la molécula que se quiere incluir, como consecuencia del ajuste a la cavidad de la ciclodextrina.

III.A.2.2.5 METODOS TERMICOS

Paralelamente se realizaron el estudio por termogravimetría (TG), tanto para el complejo liofilizado correspondiente a la concentración de retinal 4×10^{-3} M, como para la mezcla física retinal/CD preparada en la misma relación en peso. Para la obtención de las curvas de termogravimetría, se pesó una cantidad apropiada en la microbalanza y se barrió un intervalo de temperaturas comprendido entre los 30°C y los 320°C .

III.A.2.3 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS RETINOIDES TRAS LA FORMACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION CON CD MEDIANTE HPLC. FOTOISOMERIZACION DE RETINOIDES

Dado que el proceso de inclusión podría ser responsable de una isomerización parcial de las moléculas a incluir, debido al tiempo necesario para la preparación de los complejos y teniendo en cuenta que las ciclodextrinas catalizan numerosas reacciones fotoquímicas, se decidió estudiar si tras la formación de complejos de inclusión con un determinado isómero aparece otro isómero geométrico. Para determinar la posible existencia de alguno de estos isómeros se utilizó HPLC con detección UV-VIS, por lo cual transcurrido el tiempo de agitación, se analizaron los distintos complejos por HPLC.

Para llevar a cabo la identificación y cuantificación de los isómeros geométricos de los distintos retinoides por cromatografía (HPLC) se prepararon soluciones de concentraciones aproximadamente cinco veces superiores a las utilizadas para determinar los espectros de absorción. Esta decisión se tomó con el fin de evitar que las soluciones se degradasen excesivamente, ya que se comprobó que cuanto menor era la concentración de la muestra más rápidamente se degradaba al ser sometida a irradiación. Los disolventes que se utilizaron para preparar estas soluciones fueron hexano, etanol y acetonitrilo.

Cuando se realizaron las separaciones cromatográficas en fase normal, el tipo de columna utilizado fue Lichrosorb Si 60 y como eluyente se utilizó una mezcla de hexano/eter etílico (95:5 ó 98:2, v/v según los casos). La velocidad de flujo utilizada varió entre 0'5 mL/min y 1'5 mL/min, dependiendo del tiempo de retención del compuesto estudiado. En algún caso se utilizó como fase móvil una mezcla de etanol/hexano (5:95, v/v).

Cuando se llevaron a cabo las separaciones en fase inversa, el tipo de columna empleado fue del tipo C₁₈ Spherisorb ODS. En este caso el tipo de eluyente usado fue de naturaleza polar, utilizándose en la mayoría de los casos una mezcla de agua y acetonitrilo en proporciones variables. En el caso concreto del ácido retinoico se empleó una mezclas de solventes más compleja: acetonitrilo/metanol/isopropanol/agua/ácido acético (30:25:15:30:5, v/v).

En primer lugar, antes de analizar mediante HPLC las soluciones con ciclodextrina, se buscó optimizar la técnica, para lo cual se inyectaron soluciones patrón de retinal *todo-trans* y de sus isómeros, el 9-*cis* y el 13-*cis* y se midieron los tiempos de retención de cada uno de ellos. De este modo se seleccionó la sensibilidad y la velocidad de flujo y se identificaron los compuestos patrones mediante su tiempo de retención (t_r). Se utilizaron tres disolventes de polaridad diferente (hexano, etanol y acetonitrilo) para solubilizar los productos objeto de estudio, determinándose los tiempos de retención en cada caso.

Teóricamente, en fase normal, el eluyente debería ser capaz de desplazar el retinoide del interior de la ciclodextrina y los tiempos de retención deberían ser muy parecidos a los que se obtienen en el caso de que no hubiera complejo. Cuando se utiliza la fase inversa lo que se espera es hallar los tiempos de retención correspondientes al complejo como tal, ya que la fase móvil (polar) debería ser capaz de arrastrar a la ciclodextrina. Asimismo se espera que, si por ejemplo la ciclodextrina protege a la molécula de forma eficaz, después de la irradiación no se formen isómeros o lo hagan en muy pequeña proporción.

Se observa como se produce la formación de los distintos isómeros, según el tiempo de irradiación y el disolvente utilizado, en función del número y posición de los picos que aparecieron en los cromatogramas. Una vez que se han obtuvieron este tipo de datos, se inyectó una solución que contenía el retinoide con la ciclodextrina, repitiéndose el mismo proceso que el que se ha descrito para las soluciones orgánicas. Los ensayos se realizaron tanto en fase normal como en fase inversa.

Para estos estudios de fotoisomerización, se dispusieron las soluciones en cubetas de cuarzo de caras transparentes que se colocaron a 10 cm de la fuente de radiación, en cuyo fondo se colocó un pequeño agitador magnético para facilitar la homogeneización de la solución contenida en la cubeta. Entre la cubeta y la fuente se dispuso un filtro de corte Corning 3-74, que permite únicamente el paso de radiaciones de longitud de onda mayor o igual a 380 nm. De esta manera se evitan otras posibles reacciones fotoquímicas que pudieran tener lugar si están presentes compuestos que absorben a longitudes de onda más cortas.

Los tiempos de irradiación empleados con el fin de alcanzar el equilibrio fotoestacionario, se eligieron generalmente a intervalos de 30 minutos, aunque en algunos casos se tomaron intervalos más cortos, según los resultados obtenidos, hasta un tiempo total que osciló entre los 60 y los 90 minutos. Para el caso particular del 13-*cis* retinal las muestras se llegaron a irradiar durante 120 minutos.

III.A.2.4 DETERMINACION CUANTITATIVA DE RETINOIDES

Se utilizaron concentraciones constantes de ciclodextrina y concentraciones variables del retinoide realizándose las curvas de calibrado en cada caso. Para ello se utilizaron fundamentalmente los espectros de absorción de las correspondientes soluciones. Se comprobó que había una mejora significativa de la absorción de los retinoides, si se compara con los resultados obtenidos en agua, ya que por ejemplo, se ve claramente que ha habido un notable incremento en la solubilidad de estas moléculas con respecto al agua.

Para la obtención de las curvas de calibrado en agua, se preparó una solución madre del retinoide en etanol, de concentración 5×10^{-3} M (para el todo-*trans* retinal se preparó asimismo una solución madre 5×10^{-4} M). Se tomaron alícuotas de dicha disolución (entre 20 y 100 μ L), completando en cada caso hasta 100 μ L con etanol y después llevando el volumen hasta 10 mL con agua destilada, con el fin de obtener una concentración final comprendida entre 1×10^{-5} M - 5×10^{-5} M, (en el caso del todo-*trans* retinal se midieron asimismo concentraciones en el intervalo 1×10^{-6} M - 5×10^{-6} M). Para las curvas de calibrado obtenidas para los complejos de inclusión con ciclodextrinas, la metodología de trabajo empleada fue la misma, salvo en el hecho de que antes de la preparación del complejo se procedió a la evaporación del solvente orgánico. En todos los casos la concentración de ciclodextrina utilizada fue 1×10^{-2} M.

III.B. RESULTADOS Y DISCUSION

III.B.1 FORMACION, DETECCION Y SEGUIMIENTO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION DE RETINOIDES CON CICLODEXTRINAS

III.B.1.1 ESTUDIO ESPECTROFOTOMETRICO Y ESPECTROFLUORIMETRICO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION. ESTUDIO PARALELO DE LA SOLUBILIZACION DE RETINOIDES EN MEDIOS MICELARES

Los distintos retinoides presentan bandas de absorción de elevada intensidad en la región de 300 a 400 nm cuando están disueltos en solventes orgánicos. Una de las formas más sencillas de detectar la formación de complejos de inclusion con ciclodextrinas consiste en observar la aparición de máximos de absorción o fluorescencia, desplazamientos en los máximos ya existentes o bien variaciones en la intensidad de los mismos.

Por otra parte, como ya se ha comentado en el apartado II.A.3., el retinol y el acetato de retinilo presentan una débil fluorescencia verde característica, por lo que estos compuestos se pueden detectar adecuadamente por espectrofluorimetría. Las modificaciones en las posiciones de los máximos de excitación y emisión fluorescente o su intensidad relativa, constituyen una prueba evidente de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Sin embargo para el retinal y el ácido retinoico no se ha detectado fluorescencia en disolventes orgánicos hasta la fecha.

En este estudio se describen los cambios observados en los espectros de absorción y fluorescencia de los distintos retinoides como consecuencia de la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Teniendo presente la baja solubilidad de estos compuestos en agua, tras la formación del complejo se observa la aparición de bandas de absorción acompañadas de ensanchamientos y desplazamientos de los máximos con respecto a los observados en solventes orgánicos; igualmente se aprecia una débil emisión a temperatura ambiente, en el caso de los derivados considerados como no luminiscentes, así como pequeñas variaciones en las posiciones de los máximos de excitación y fluorescencia e intensidad en las bandas en el caso de los compuestos luminiscentes.

En este apartado se presentan de forma conjunta los resultados obtenidos mediante técnicas espectrofotométricas de absorción UV-VIS y espectrofluorimétricas, dado que los espectros de absorción contienen una información imprescindible para la posterior interpretación de los resultados obtenidos por espectrofluorimetría. Asimismo, la espectrofotometría UV-VIS nos permite evaluar el retinoide disuelto y la formación del complejo de inclusión. En estas condiciones ocasionalmente se puede observar fluorescencia.

Comenzaremos describiendo los resultados obtenidos para el retinal con las distintas ciclodextrinas, ya que al igual que para el resto de los ensayos, el retinal fue tomado como molécula modelo atendiendo a sus peculiares características espectroscópicas y fotoquímicas.

III.B.1.1.1 TODO-*TRANS* RETINAL/CICLODEXTRINAS

III.B.1.1.1.1 RETINAL/ β -CD

En la FIGURA 40A se muestra el espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ β -CD obtenido por el procedimiento habitual, en el que se puede apreciar que en solución acuosa y tras la formación del complejo de inclusión aparece la banda característica de absorción del retinal con un máximo situado a 385 nm. Cabe señalar que el perfil de la banda de absorción se ensancha con respecto al que se observa en solución etanólica o en hexano. Este ensanchamiento, así como el desplazamiento en el máximo de absorción, de aproximadamente 17 nm con respecto al que se presenta en hexano ($\lambda_{\text{max}} = 368$ nm, FIGURA 41) y muy semejante al que exhibe el compuesto en etanol (380 nm, FIGURA 42), puede atribuirse al efecto del microentorno (polaridad) en el que se encuentra inmersa la molécula.

La FIGURA 43 muestra el espectro de absorción del complejo retinal/ β -CD obtenido por el procedimiento habitual, como el que se describe en la FIGURA 40A. Sin embargo, es notoria la diferencia entre ambos perfiles espectrales. El protocolo de trabajo es el mismo en ambos casos y sin embargo, en la FIGURA 43 puede apreciarse la aparición de un máximo de absorción pronunciado en torno a 280 nm. Este máximo está presente en numerosas ocasiones y se aprecia cuando no se ha conseguido una buena solubilización

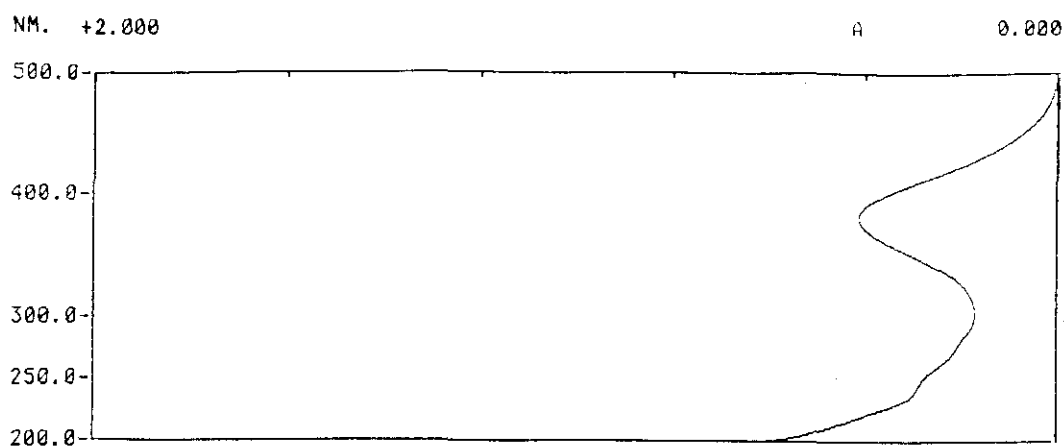


FIGURA 40A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

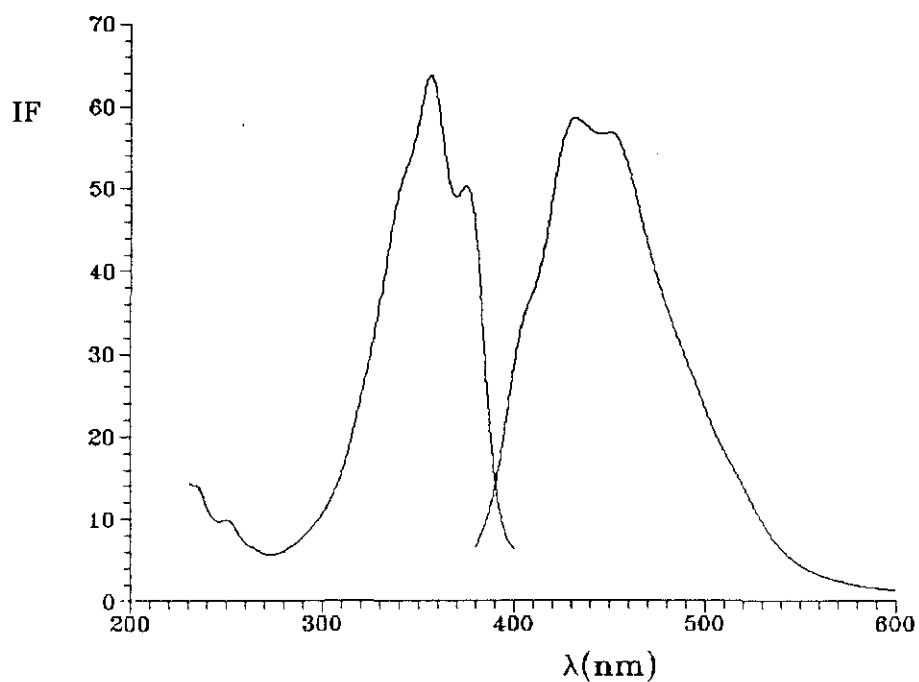


FIGURA 40B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$) del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

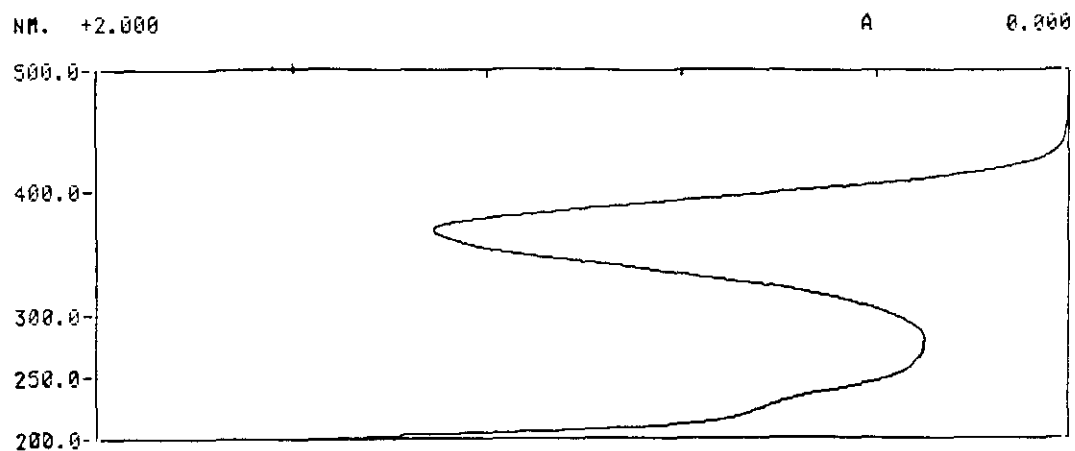


FIGURA 41: Espectro de absorción UV-VIS del retinal en hexano. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

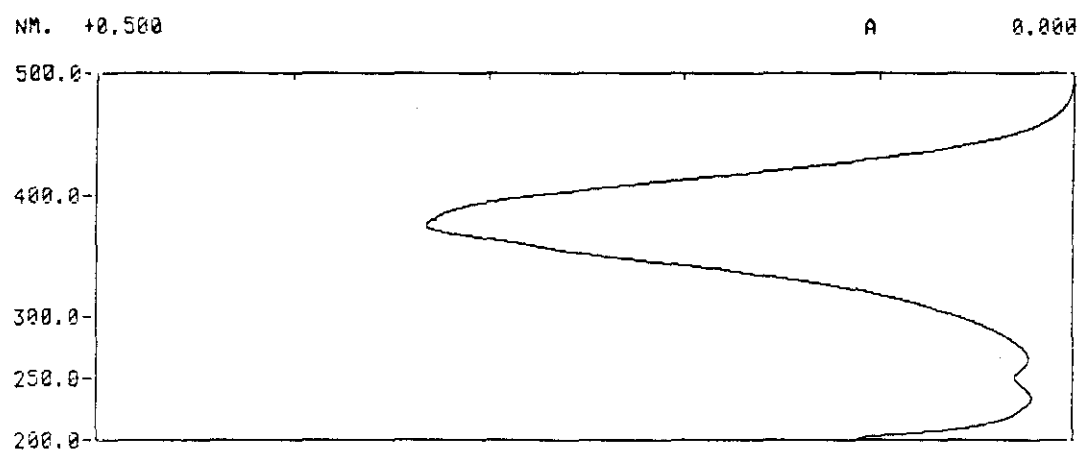


FIGURA 42: Espectro de absorción UV-VIS del retinal en etanol. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

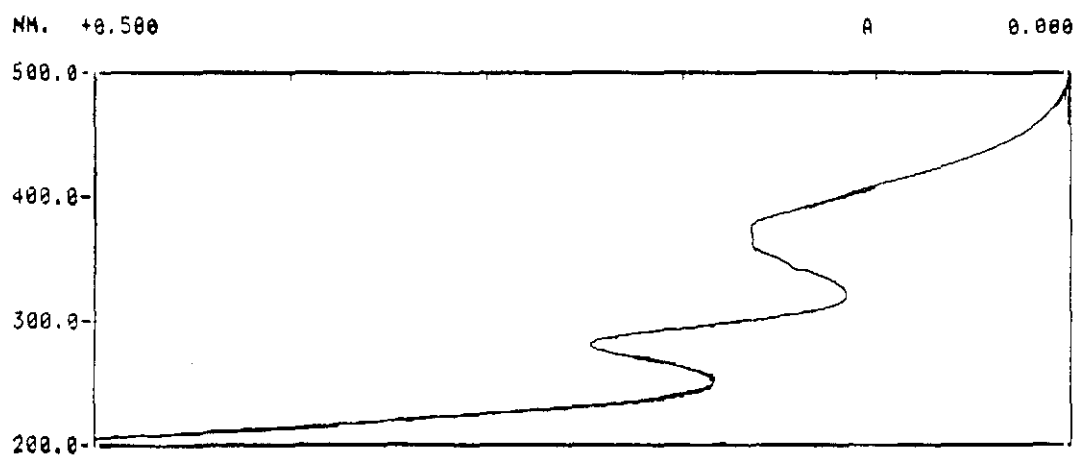


FIGURA 43: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

del compuesto y por tanto la banda de 380 nm no es lo suficientemente intensa como para enmascarar la de 280 nm.

Este máximo aparece principalmente cuando se forman los complejos con β -CD y en raras ocasiones en el caso de la HP β -CD. Este hecho puede relacionarse con la solubilidad en agua de estas ciclodextrinas. Así pues, la β -CD es mucho menos soluble que la HP β -CD y sus complejos de inclusión presentan un comportamiento paralelo, en lo que a solubilidad se refiere. Si en la solución acuosa existen partículas sin solubilizar, ya sean de retinal, de β -CD libre o de complejo no solubilizado, son todos ellos origen de microcristales, que pueden ser responsables de fenómenos de dispersión y absorción en torno a los 280 nm.

También se registraron de forma paralela los espectros de fluorescencia para los complejos con β -CD solubilizada. Hemos de señalar en este punto que no siempre se obtiene fluorescencia apreciable, aún en los casos en que los espectros de absorción ponen de manifiesto la existencia del complejo de inclusión. Cuando se observa fluorescencia se puede apreciar el espectro de excitación con un máximo situado a 355 nm, entonces el espectro de emisión presentó un máximo bien resuelto a 430 nm acompañado, de un hombro a 450 nm, el cual no siempre se puede apreciar de forma clara.

Nuestros trabajos anteriores [1990 L LV] demostraron la existencia de un complejo de inclusión entre β -CD y retinal, que exhibe luminiscencia a temperatura ambiente con un rendimiento cuántico de fluorescencia de 7×10^{-3} . El valor numérico del rendimiento cuántico pone de manifiesto que la cavidad de la ciclodextrina aporta una protección muy eficaz al estado excitado del retinal de tal forma que puede observarse luminiscencia para una molécula que en solución y a temperatura ambiente no la exhibe, y que únicamente se manifiesta a 77 K y en disolventes orgánicos secos con un rendimiento cuántico de 10^{-4} [1978 JACS 2626].

Una vez comprobada la formación del complejo de inclusión entre retinal y β -CD, se decidió estudiar si el tiempo de agitación además de contribuir la formación del complejo, pudiera ser causa de degradación de la molécula que se quiere incluir y consecuentemente en este caso, habría que controlarlo cuidadosamente. En las FIGURAS 44A y 44B se muestra la evolución en la formación del complejo de inclusión por

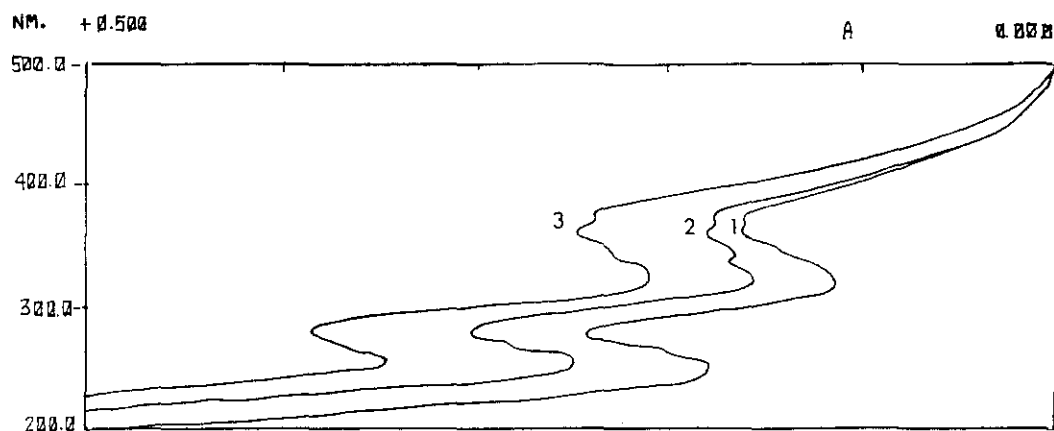


FIGURA 44A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. Evolución con el tiempo de agitación. 1) 18 h de agitación; 2) 24 h de agitación; 3) 48 h de agitación, A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

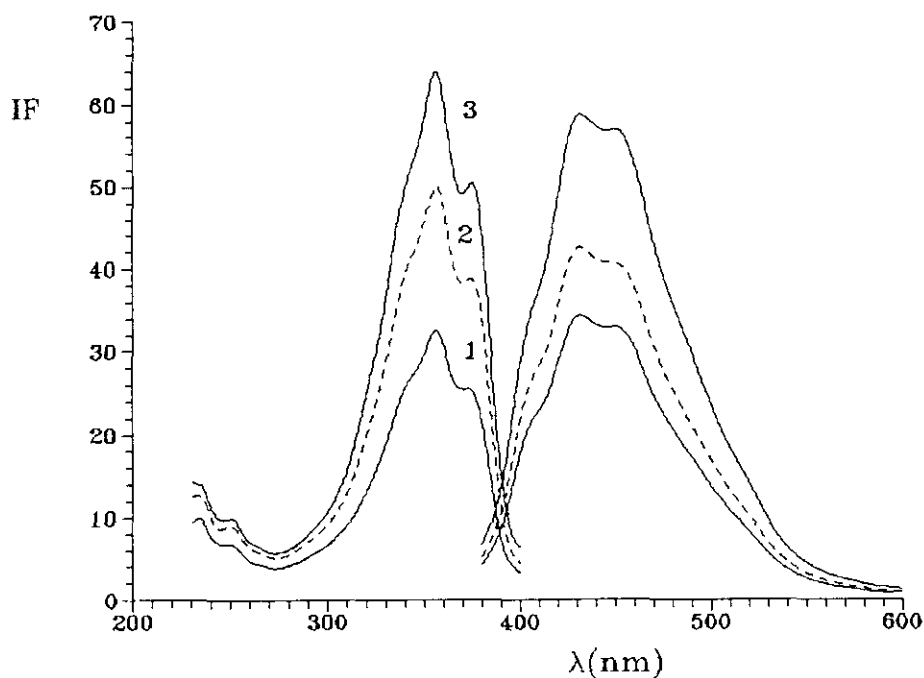


FIGURA 44B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} \approx 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. Evolución de la intensidad de fluorescencia del complejo con el tiempo de agitación. 1) 18 h de agitación; 2) 24 h de agitación; 3) 48 h de agitación, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

espectrofotometría de absorción UV-VIS y por espectrofluorimetría respectivamente. Se puede apreciar en ambas figuras, ya que el comportamiento es paralelo, que a las 18 horas ya existe formación de complejo. Puesto que las señales de fluorescencia obtenidas entre las 24 y las 48 horas son notables y que no se observa desaparición de las mismas en este tiempo de agitación, se realizaron todas las medidas dejando transcurrir 24 horas de agitación con el fin de agilizar los ensayos y puesto que se considera que ya se ha formado el complejo y además que el tiempo durante el que se prolonga el experimento es aceptable.

Una vez establecido el periodo considerado óptimo para la formación del complejo de inclusión, se estudió la evolución del complejo en solución después de obtenido el mismo. En la FIGURAS 45A y 45B se presentan los espectros de absorción UV-VIS y de fluorescencia, obtenidos cuando la solución se dejó en la oscuridad y a temperatura ambiente después de 0, 10 y 20 días. Las variaciones en la absorbancia y en la intensidad de fluorescencia no son significativas por lo que puede afirmarse que el complejo es estable en solución y que por tanto la β -CD proporciona un entorno adecuado que evita la degradación de un compuesto lábil como es el retinal.

A la vista de los resultados anteriores, podría considerarse que el complejo fuese estable pero que se isomerizase en solución, aunque en el caso de la β -CD los estudios de fotodegradación por HPLC ponen de manifiesto que la β -CD protege a la molécula. Sin embargo, si apareciesen isómeros aunque en muy baja proporción, la contribución al perfil de los espectros de absorción y de fluorescencia sería semejante ya que ninguna de las dos técnicas nos permite discernir entre estos isómeros geométricos.

El **complejo sólido** retinal- β CD se obtuvo según el procedimiento descrito en el apartado III.A.2.1 (método 2). En este caso las concentraciones de retinal son superiores a las habituales empleadas para la obtención del complejo en solución acuosa, debido a que la metodología experimental así lo requería. En la FIGURA 46A se puede observar el espectro de absorción UV-VIS obtenido tras la formación del complejo sólido retinal/ β -CD y su posterior disolución en agua en la proporción adecuada. El perfil espectral es fino y recuerda a los que se obtienen en solventes orgánicos como hexano y etanol. Sin embargo se pone de manifiesto la formación del complejo de inclusión por el desplazamiento batocrómico del máximo de absorción, que se sitúa a 385 nm, al igual que el obtenido para

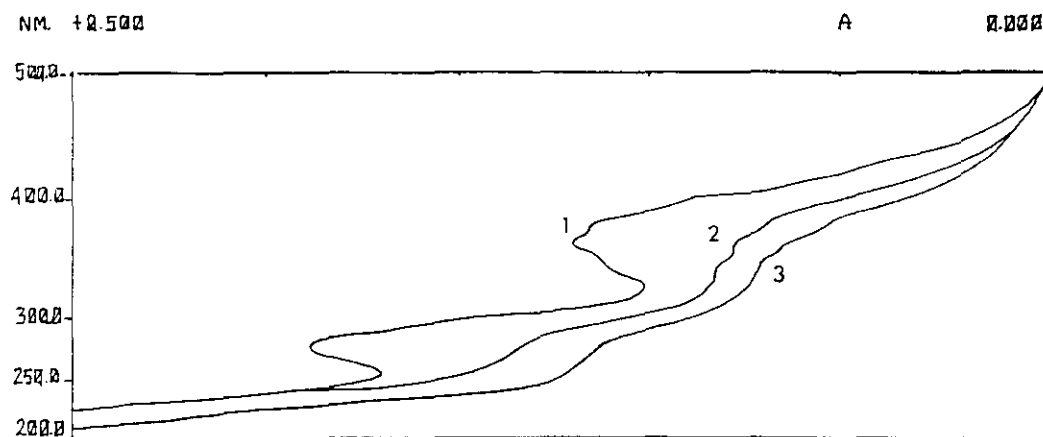


FIGURA 45A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. Evolución con el tiempo transcurrido una vez que se ha formado el complejo. 1) 24 h; 2) 10 días; 3) 20 días. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

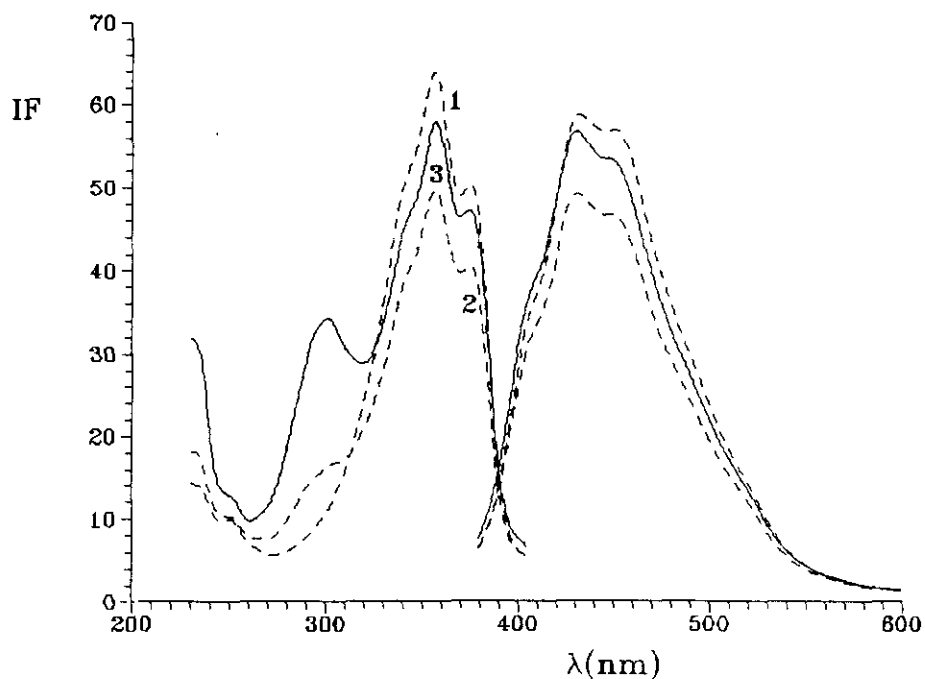


FIGURA 45B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo retinal/ β -CD en solución acuosa. Evolución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo transcurrido una vez formado el complejo. 1) 24 h; 2) 10 días; 3) 20 días, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

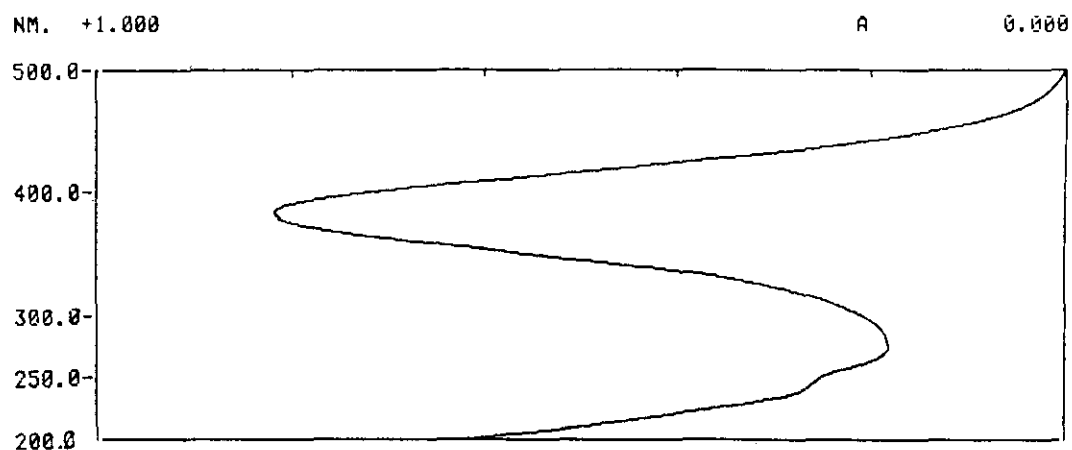


FIGURA 46A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ β -CD (sólido) en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

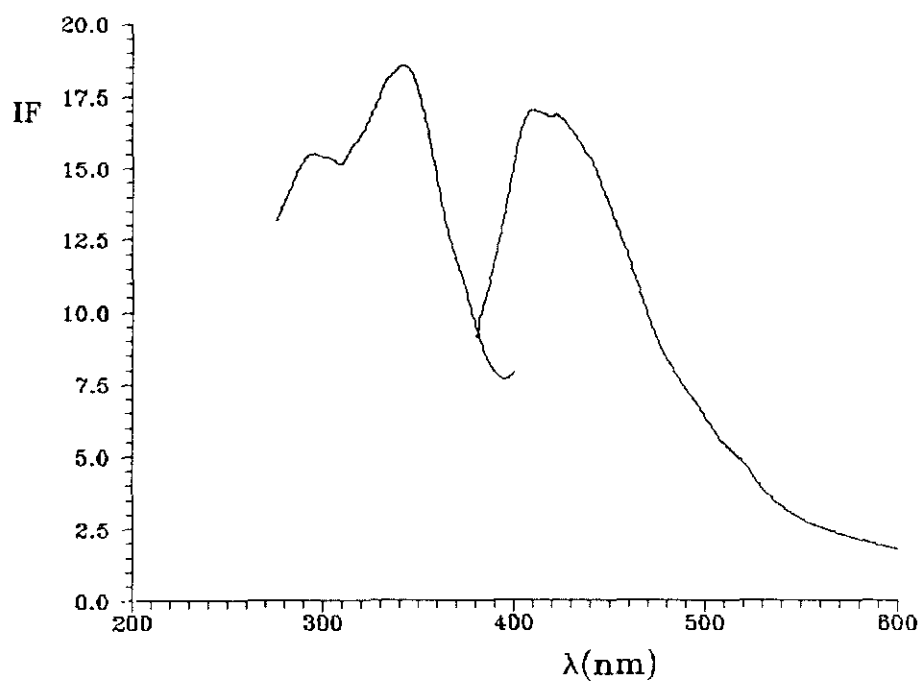


FIGURA 46B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/ β -CD (sólido) en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

el complejo en solución. Como en ese caso, en ocasiones, cuando se intenta la formación del complejo sólido y se detecta espectrofotométricamente, se observa la aparición de un hombro a 280 nm (FIGURA 47).

En la FIGURA 46B se muestra los máximos de excitación y emisión característicos del complejo sólido, ya descritos para el complejo en solución. Cabe señalar que en este caso la resolución espectral es menor que la que se aprecia para el complejo en solución. Igualmente la intensidad de fluorescencia es menor.

Formación de complejos ternarios con alcoholes

Como ya se ha descrito en el apartado II.A.2.1. se intentó la formación de complejos de inclusión en presencia de alcoholes, puesto que como se describe en la bibliografía [1991 AC 1018] [1991 JACS 1573], la formación de complejos ternarios CD/huésped/alcohol conlleva la estabilización del complejo y la mejora de las características espectrofotométricas y espectrofluorimétricas de la molécula que se va a incluir. En consecuencia se seleccionaron como alcoholes el *n*-butanol y el *terc*-butanol por ser inmiscibles con el agua y porque en el caso del *terc*-butanol parece que se sitúa en el borde de la cavidad de la ciclodextrina, impidiendo que la molécula huésped salga de su interior y por tanto estabilizando el complejo de inclusión.

En la FIGURA 48 se muestra el espectro del complejo retinal/ β -CD en el que previamente se ha incorporado *terc*-butanol. Como se puede apreciar, la intensidad de absorción no se incrementa de forma significativa por la adición de alcohol. En la FIGURA 49 se muestra el espectro de absorción del complejo retinal/ β -CD al que se ha añadido una parte alícuota, de 1 mL, de *terc*-butanol después de haber formado el complejo. El espectro de absorción UV-VIS presenta una intensidad ligeramente más baja que en el caso anterior y ello puede deberse al hecho de que si el *terc*-butanol no forma el complejo ternario, debe favorecer la salida de la molécula de retinal, que por tanto se solubilizará en la fase orgánica.

Para el *n*-butanol, los resultados fueron análogos no obteniéndose mejora en la formación del complejo por lo cual se descartó este procedimiento.

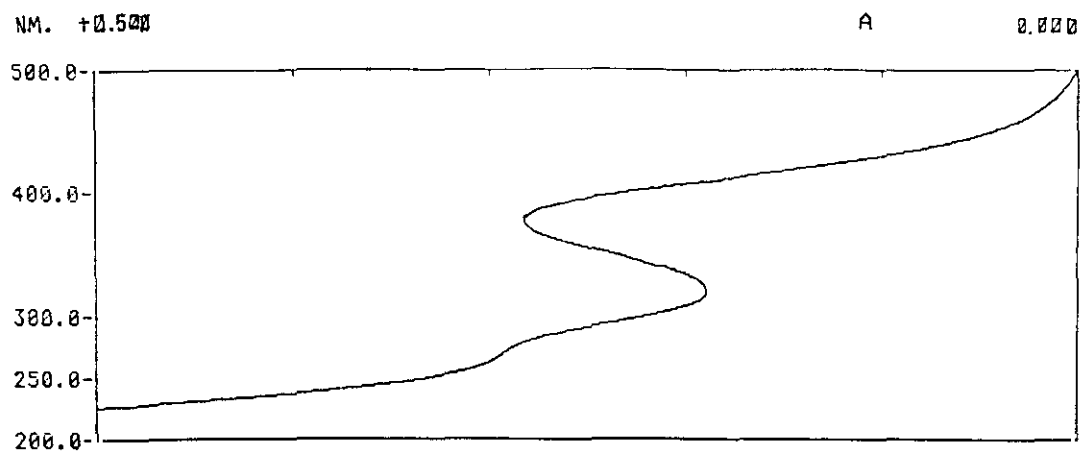


FIGURA 47: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/β-CD (sólido) en solución acuosa. A: absorbancia, λ: longitud de onda (nm).

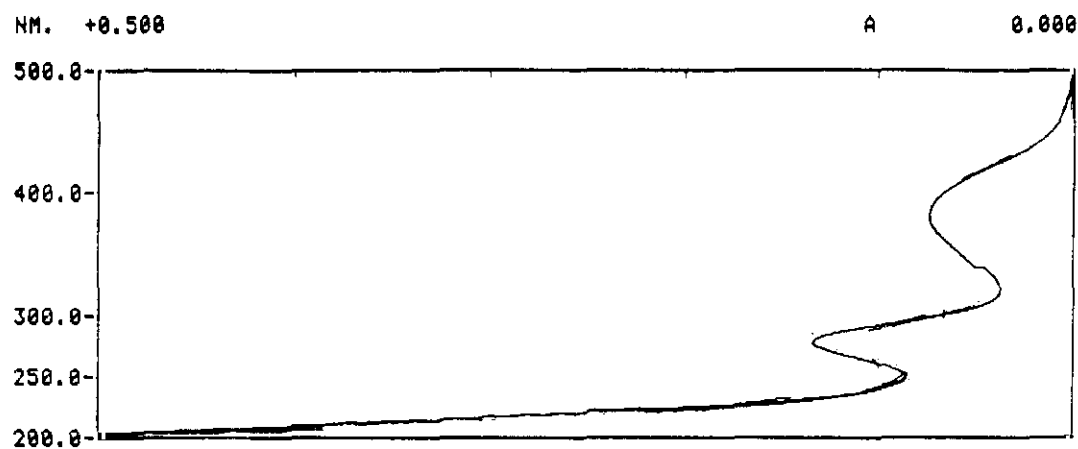


FIGURA 48: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/β-CD/terc-butanol. El terc-butanol (1 %) se incorporó antes de formar el complejo, A: absorbancia, λ: longitud de onda (nm).

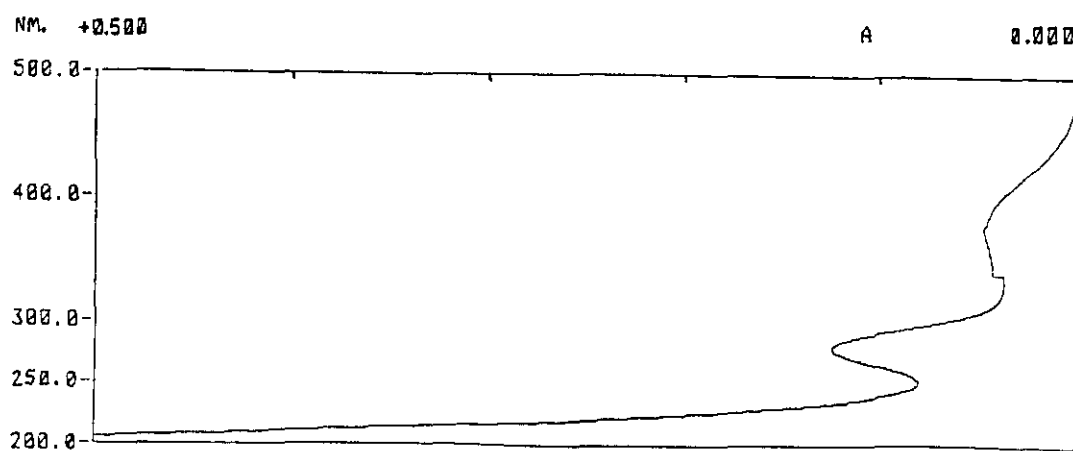


FIGURA 49: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/β-CD/terc-butanol. El terc-butanol (1 %) se incorporó después de la formación del complejo, A: absorbancia, λ: longitud de onda (nm).

III.B.1.1.1.2 RETINAL/HP β -CD

Los complejos de retinal con HP β -CD son más solubles en agua que los obtenidos con β -CD, debido a que la HP β -CD es también más soluble en agua, lo cual nos permite trabajar con concentraciones de ciclodextrina mayores que en el caso anterior y por tanto se debería favorecer el equilibrio de inclusión. En la FIGURA 50A se presenta el espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/HP β -CD, en el que se puede apreciar que el máximo de absorción para el complejo aparece a 387 nm, ligeramente desplazado con respecto a lo que se describe para los complejos retinal/ β -CD ($\lambda_{\text{max}} = 385$ nm). Este pequeño desplazamiento puede atribuirse, bien al entorno de la HP β -CD que es ligeramente diferente del de la β -CD, como al hecho de que la cantidad de retinal disuelto puede ser mayor y por tanto el desplazamiento batocrómico sea una consecuencia del aumento en la concentración de ciclodextrina [1982 L XXXIV].

Dado que la solubilidad en agua de la HP β -CD es mayor que la de la β -CD, es menos probable que se produzcan fenómenos de agrupación de microcristales, por lo que en muy pocas ocasiones puede observarse la aparición de la banda a 280 nm. Sin embargo, cuando se preparó el complejo según el método 3 (gota de cloroformo), puede apreciarse en el espectro de absorción un hombro a 280 nm (FIGURA 51), el cual puede atribuirse a moléculas de retinal no solubilizadas. La cantidad de complejo formado parece pequeña puesto que no aparece la banda de absorción característica, con el máximo a aproximadamente 380 nm y además el perfil de absorción está notablemente modificado. Por todo ello este método de preparación del complejo no se consideró como el más adecuado.

Los espectros de excitación y emisión fluorescente (FIGURA 50B) muestran máximos situados a las mismas longitudes de onda que las que se aprecian para los complejos retinal/ β -CD. Las características de la inclusión para ambas ciclodextrinas son por tanto son muy semejantes.

De forma análoga a lo descrito para la β -CD, se obtuvo el **complejo sólido** retinal/HP β -CD, y una vez obtenido se disolvió en agua, registrándose el espectro de absorción de esta solución (FIGURA 52A). Al igual que en el caso de la β -CD, la banda de absorción para el complejo sólido es más intensa que cuando el complejo se obtiene en

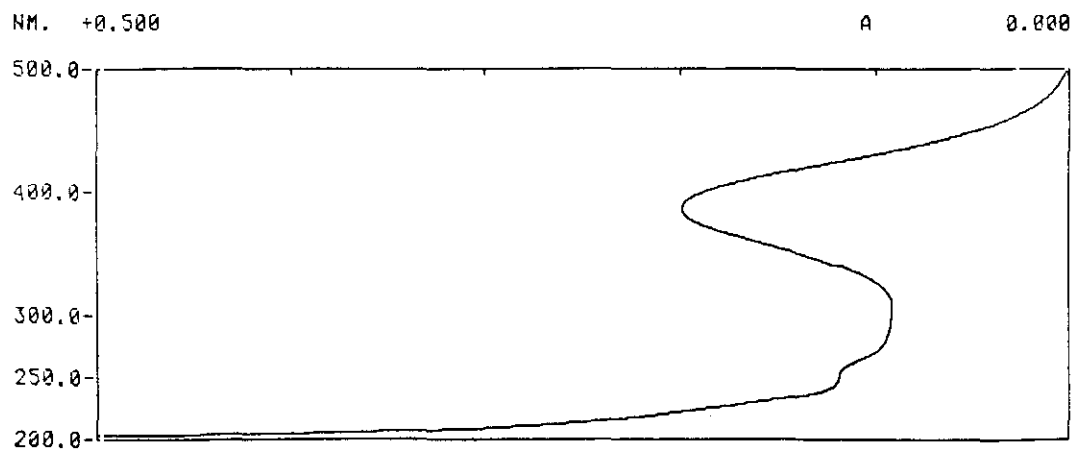


FIGURA 50A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda(nm).

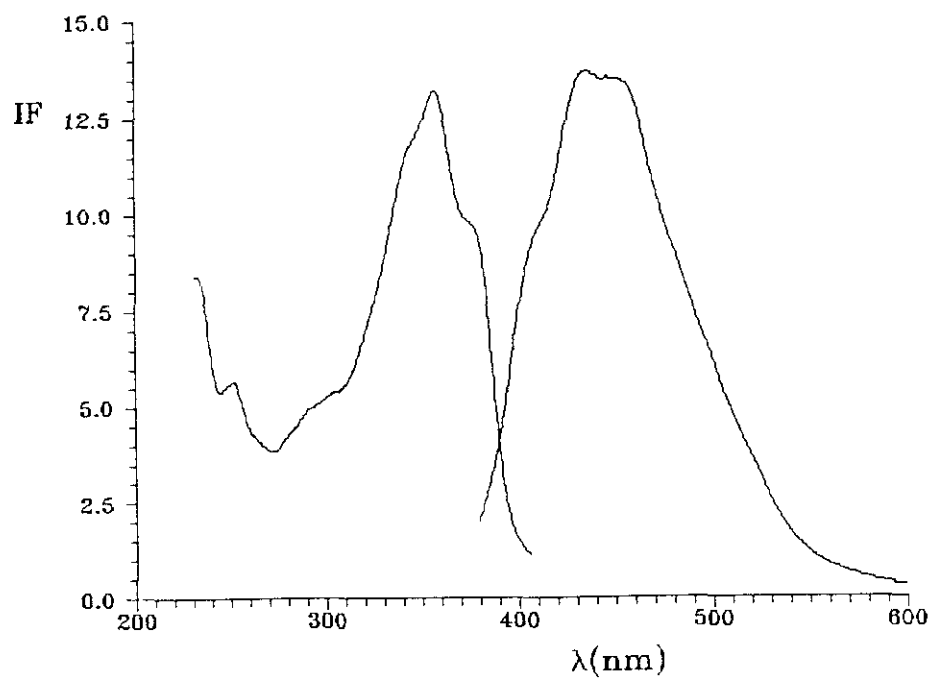


FIGURA 50B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/HP β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

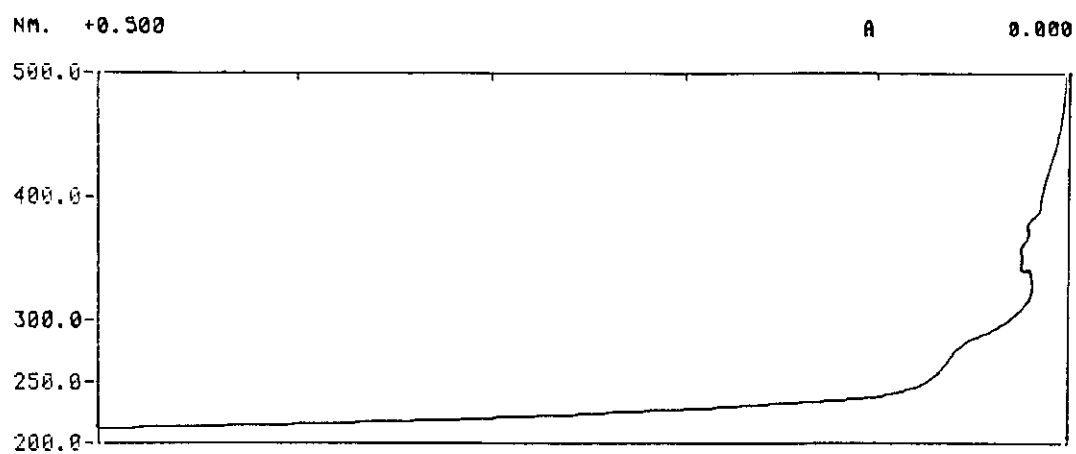


FIGURA 51: *Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/HPβ-CD en solución acuosa, preparado por el método 3, A: absorbancia, λ: longitud de onda (nm).*

solución. Asimismo el máximo de emisión para este complejo se encuentra situado a 387 nm como en el caso del complejo disuelto. Paralelamente se registraron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia. Los máximos aparecen en las posiciones características al igual que los descritos para el complejo en solución ($\lambda_{ex} = 355$ nm, $\lambda_{em} = 430$ nm), si bien el perfil espectral presenta una menor resolución (FIGURA 52B).

III.B.1.1.1.3 RETINAL/DM β -CD Y RETINAL/TM β -CD

DM β -CD y TM β -CD son dos β -ciclodextrinas modificadas que están comercializadas, por lo que se estudió si el comportamiento del retinal era análogo al de la inclusión en β -CD. Ambas ciclodextrinas son más hidrosolubles al mismo tiempo que su cavidad es más hidrófoba que la de la β -CD debido a la sustitución de los -H por grupos -CH₃. Asimismo, las características geométricas de su cavidad son ligeramente diferentes de las de la β -CD, siendo de forma más alargada, debido a los sustituyentes metílicos. Este hecho es más marcado cuanto mayor es la sustitución.

Los complejos se obtuvieron de la forma habitual y transcurrido el tiempo de agitación se registraron los espectros de absorción UV-VIS (FIGURAS 53A y 54A). La solubilización en el caso de la DM β -CD, es buena y el complejo presenta el máximo de absorción característico a 385 nm. Sin embargo, en los distintos ensayos encaminados a la obtención del complejo con la TM β -CD, la solubilización no es tan buena, como lo demuestra el hecho de que las absorbancias obtenidas son más bajas. Asimismo el máximo de absorción del complejo se presenta a 365 nm, longitud de onda muy semejante a la que exhibe el retinal disuelto en hexano.

La presencia de este máximo a una longitud de onda tan parecida a la que se obtiene en hexano podría atribuirse al hecho de que la cavidad de la TM β -CD es mucho menos polar que la de la β -CD y por tanto podría ser comparable al microentorno de un solvente de baja polaridad como es el hexano, de forma similar a como el entorno de la β -CD presenta una polaridad semejante a la del etanol. La baja absorbancia obtenida en este caso puede estar relacionada con que la capacidad de penetración de la molécula de retinal en el interior de la TM β -CD sea mucho menor, debido a que la cavidad es más alargada y más estrecha en uno de sus extremos (donde se sitúan dos de los tres sustituyentes metílicos), por donde normalmente se produciría la inclusión, por ser el borde más ancho

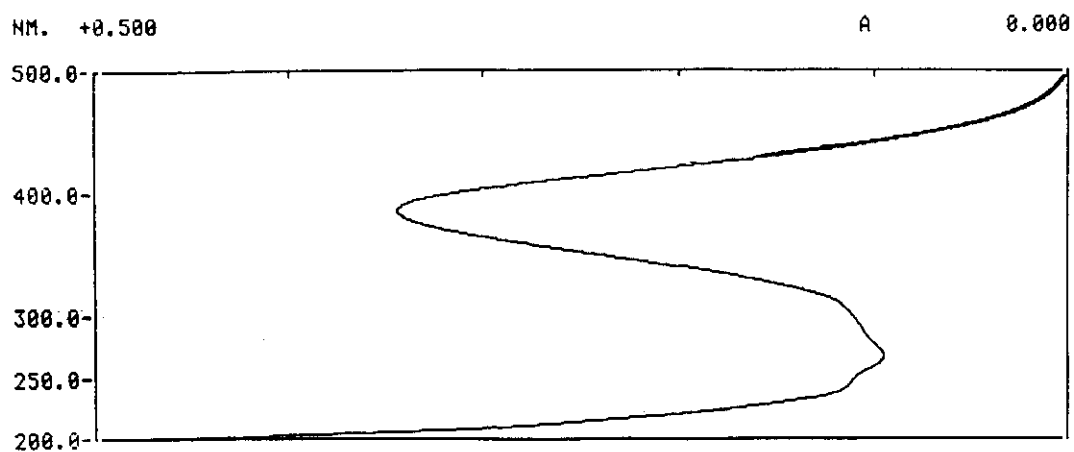


FIGURA 52A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/HP β -CD (sólido) en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

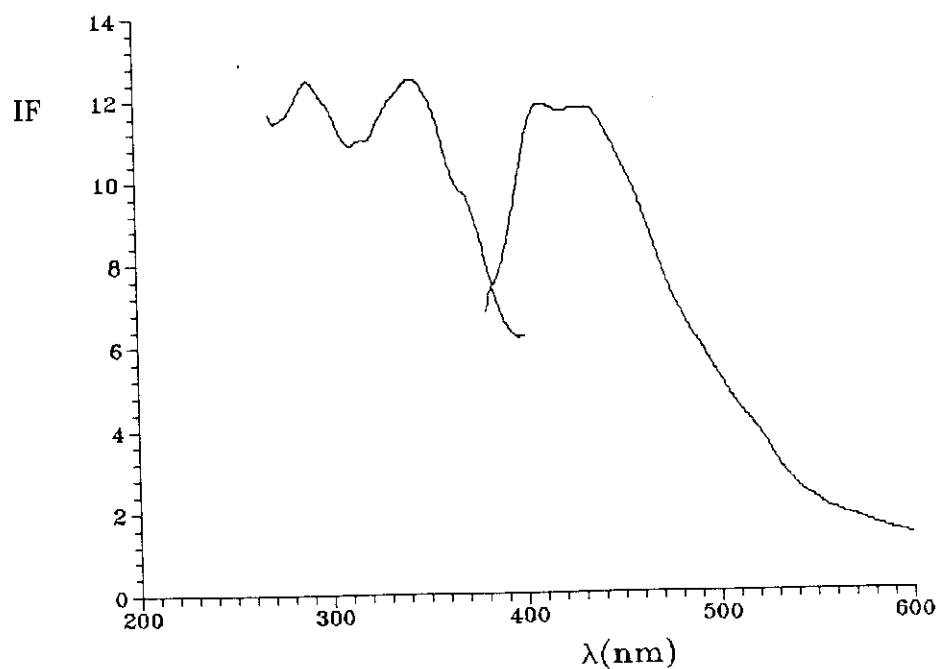


FIGURA 52B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/HP β -CD (sólido) en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

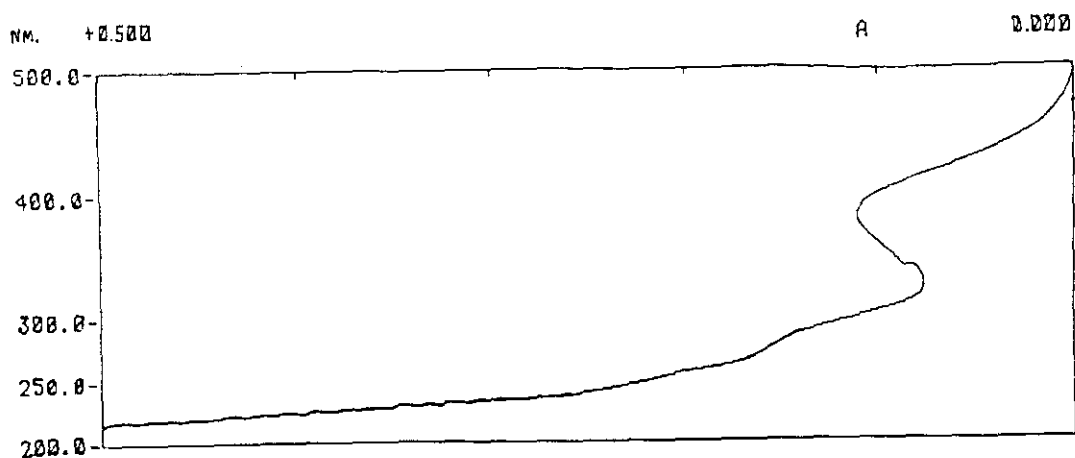


FIGURA 53A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/DM β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

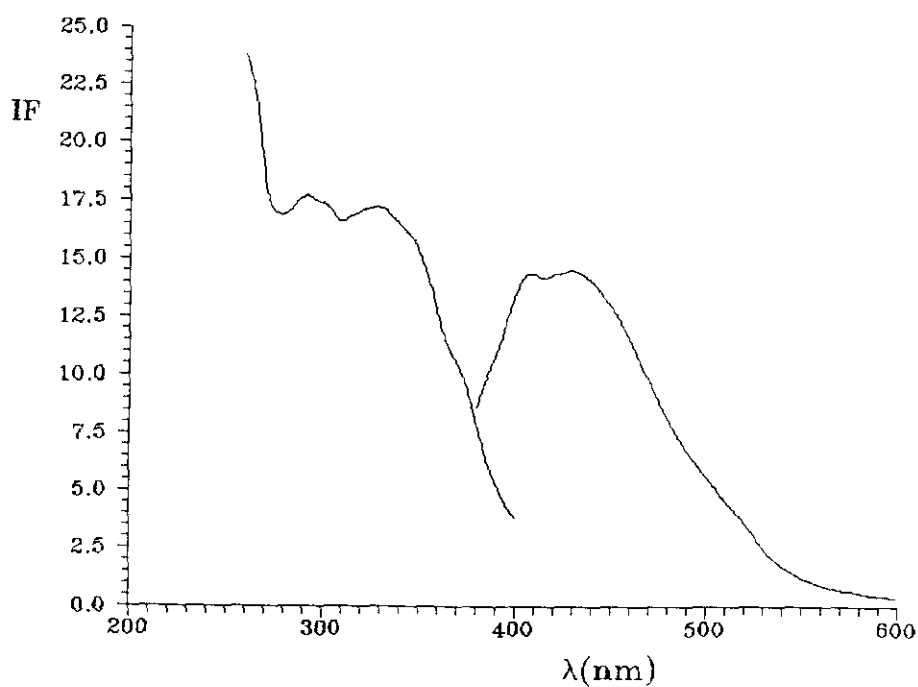


FIGURA 53B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/DM β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

del anillo de la CD. En consecuencia la inclusión está más dificultada y por tanto la fracción de moléculas solubilizadas es menor. Si consideramos que la TM β -CD presenta los -OH primarios sustituidos por grupos metilos, la entrada de la molécula huésped debe verse dificultada por estos grupos metilo y en consecuencia la solubilización es baja. En el caso de los retinoides, el resto más hidrofóbico de la molécula es el anillo de ciclohexeno a través del cual debe producirse la inclusión. Sin embargo, para la TM β -CD la entrada de este agrupamiento será extremadamente difícil.

Los espectros de fluorescencia registrados para las soluciones de estos complejos, retinal/DM β -CD y retinal/TM β -CD (FIGURAS 53B y 54B), guardan una estrecha correlación con lo que se ha descrito por absorciometría UV-VIS, ya que para el complejo de DM β -CD, la intensidad de fluorescencia obtenida es mayor que para la TM β -CD, puesto que la solubilización de la molécula, en este último caso, es menor. El descenso de la fluorescencia para TM β -CD puede estar estrechamente relacionado con la menor penetración de la molécula huésped.

Al igual que para las otras ciclodextrinas, se prepararon los **complejos sólidos** de retinal/DM β -CD y retinal/TM β -CD, disolviéndose posteriormente en un volumen apropiado de agua y posteriormente se obtuvieron los espectros de absorción UV-VIS (FIGURA 55). En estos casos, a diferencia de lo descrito para β -CD e HP β -CD, donde los espectros de absorción UV-VIS mostraron bandas finas e intensas, los espectros presentan poca resolución y las absorbancias son bajas. Los espectros de fluorescencia muestran una intensidad muy baja, por lo que su exposición resulta irrelevante.

III.B.1.1.1.4 RETINAL/ α -CD

Se prepararon complejos entre retinal y α -CD. El tamaño de esta ciclodextrina es más reducido que el de la β -CD y sus análogas modificadas, por lo que cabe esperar que la formación del complejo de inclusión tenga características distintas, en función de la geometría de la cavidad. En la FIGURA 56A, se muestra el espectro de absorción UV-VIS del complejo que se obtiene, tras 24 horas de agitación con α -CD. Se puede apreciar que la absorción es prácticamente despreciable y probablemente la absorbancia que se detecta sea debida a una pequeña fracción de retinal solubilizado. Los espectros de excitación y emisión fluorescente (FIGURA 56B) presentan una muy baja pero detectable luminiscencia,

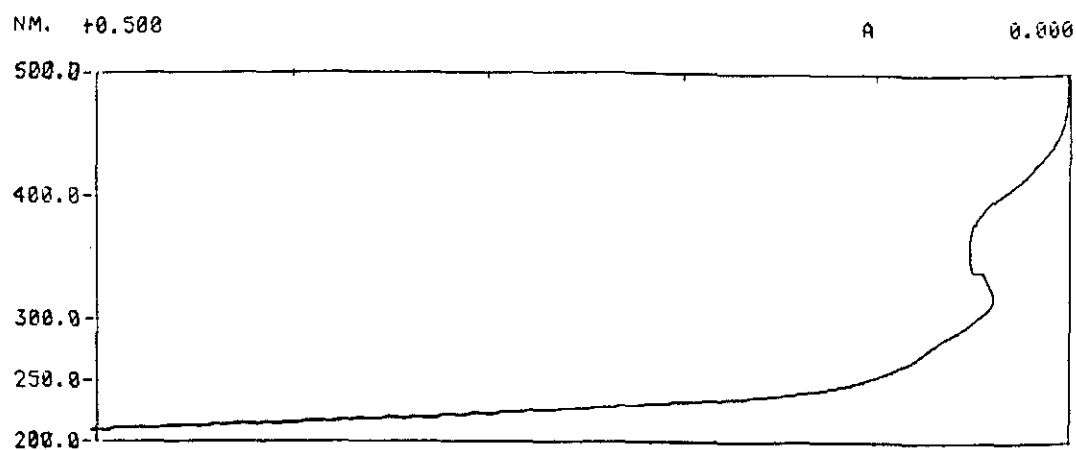


FIGURA 54A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/TMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

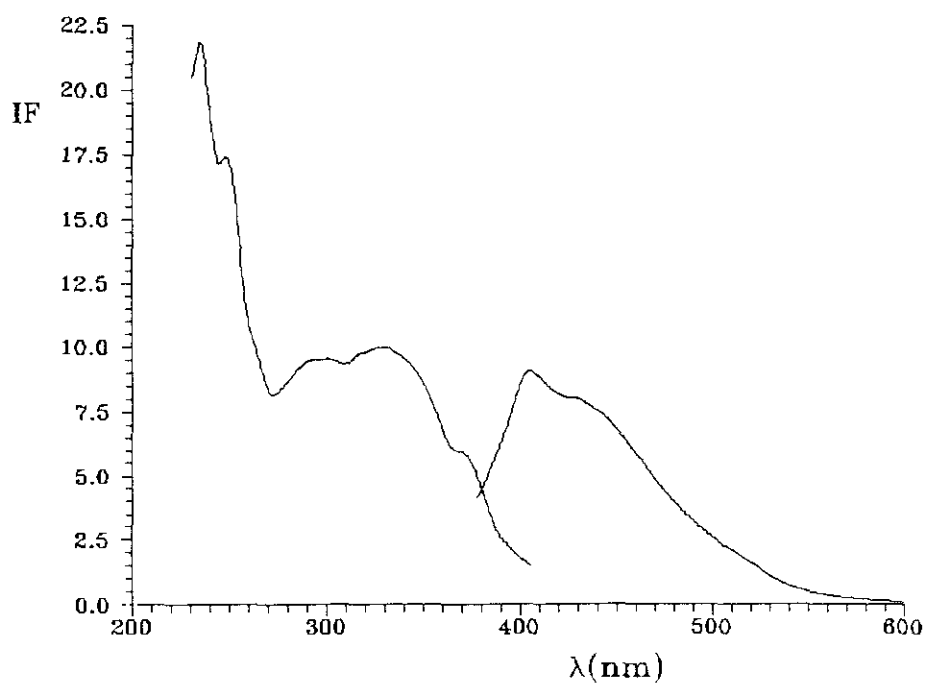


FIGURA 54B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$) del complejo retinal/TMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

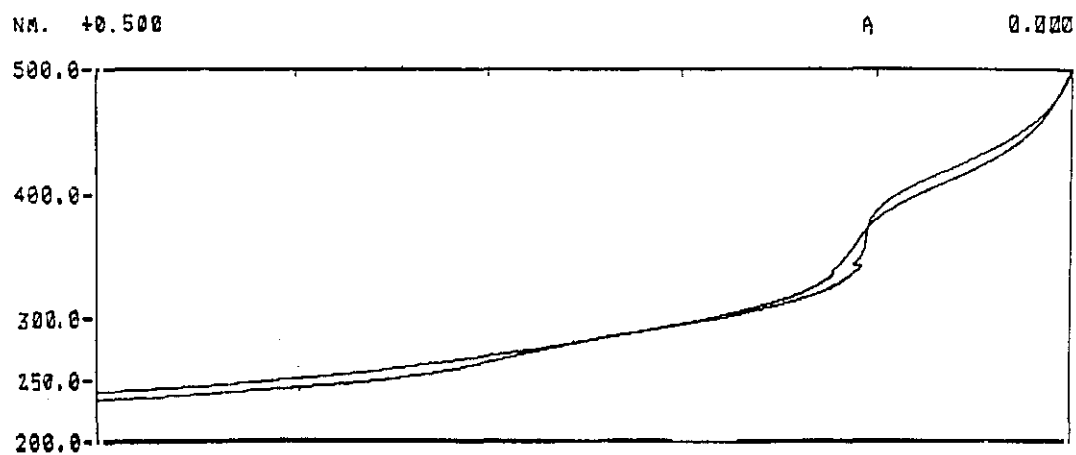


FIGURA 55: Espectro de absorción UV-VIS de los complejos retinal/DMB-CD (1) y TMB-CD (2) en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

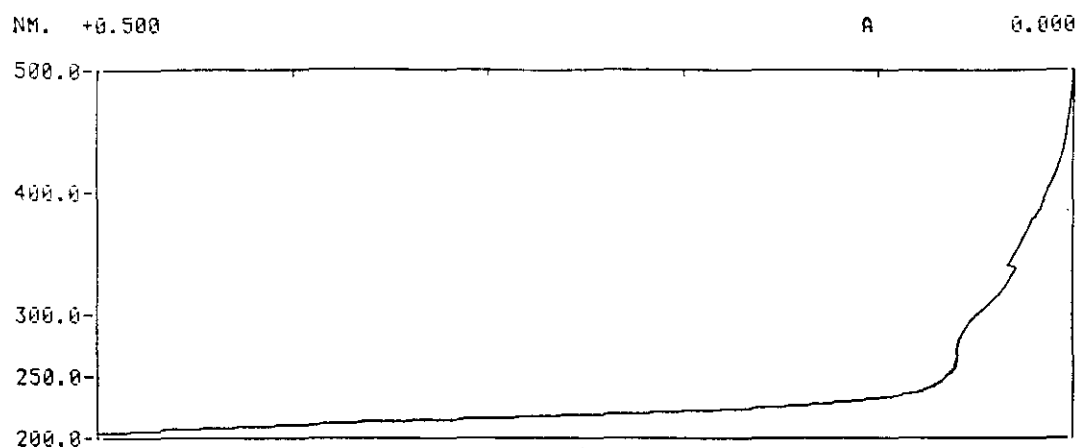


FIGURA 56A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ α -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

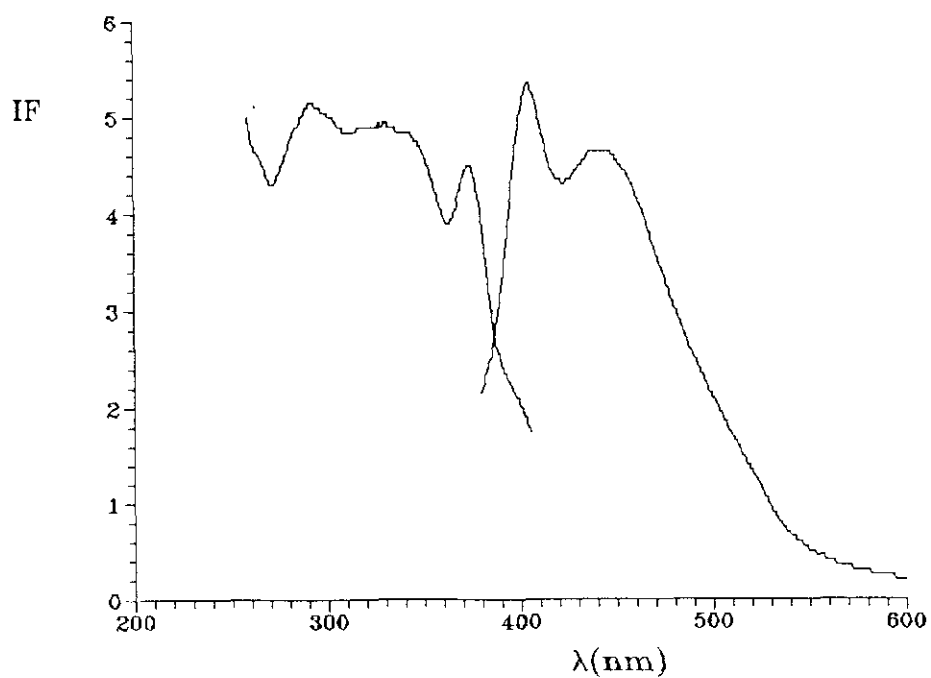


FIGURA 56B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/ α -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

mucho menor que para la β -CD y análogos, con los máximos situados en las mismas posiciones que las descritas para la β -CD. Nuestros resultados anteriores demostraron que el rendimiento cuántico de fluorescencia de este complejo es muy bajo, $< 10^{-4}$ [1989 ACA 297].

En el caso de la α -CD parece probable que la molécula de retinal forme un complejo de características muy distintas a las del complejo retinal/ β -CD, ya que el tamaño de ambas cavidades es apreciablemente diferente. En estas condiciones, el anillo de ciclohexeno probablemente no puede entrar en la cavidad de la α -CD y por ello la inclusión se produciría a través del extremo carbonílico de la cadena etilénica, que es el que presenta un tamaño adecuado para incluirse en la cavidad de la α -CD. El extremo carbonílico es el más polar de la molécula y por tanto la probabilidad de la formación de un complejo de inclusión es baja. Sin embargo dicho complejo existe, como se puede apreciar por la pequeña solubilización que se observa en el espectro de absorción.

La fluorescencia obtenida para este complejo citado es muy débil pero detectable en las condiciones habituales de medida. Ello implica que el proceso de inclusión transcurre por distintos caminos a como sucede con la β -CD. Si como hemos afirmado la parte incluida es el extremo polar de la molécula y la emisión luminiscente está relacionada con la menor desactivación del estado excitado como consecuencia de los procesos de rotación que sufre la molécula de retinal al no estar incluido el anillo de ciclohexeno, la rotación es mucho mayor y conlleva una disminución tan marcada en la fluorescencia.

En el caso de moléculas grandes, se han descrito complejos con distintas características para la inclusión, según se trate de α -, β - o γ -CD, ya que según sea el tamaño de la ciclodextrina, la parte de la molécula que entra es diferente. Así, la progesterona forma complejos de inclusión con α -CD ($K_a = 150$), β -CD ($K_a = 13.000$) y γ -CD ($K_a = 24.000$) y la digoxina con α -CD ($K_a = 180$), β -CD ($K_a = 11.200$) y con γ -CD ($K_a = 12.200$) [1987 L XLII]. En estas moléculas grandes se produce inclusión en el caso de α -CD, pero las constantes de asociación son mucho menores, probablemente porque el efecto de impedimento estérico obstaculiza el proceso. En nuestro caso, se demuestra un proceso análogo, dado que se produce un marcado descenso en el valor del rendimiento cuántico de fluorescencia para el complejo con α -CD ($\phi_f < 10^{-4}$) comparado con el rendimiento cuántico que se obtiene para el complejo con β -CD ($\phi_f = 7 \times 10^{-3}$).

Al igual que lo descrito para otros casos anteriores, se obtuvo el **complejo sólido** retinal/ α -CD. En la FIGURA 57A, se muestra el espectro de absorción UV-VIS del complejo sólido tras su disolución en agua. Se puede apreciar una banda de absorción de intensidad relativamente baja, con un máximo situado a 375 nm. En la FIGURA 57B se muestra el espectro de emisión de dicho complejo, en el que puede observarse que la intensidad de fluorescencia es muy débil.

III.B.1.1.1.5 RETINAL/ γ -CD

El espectro de absorción UV-VIS del complejo formado entre el retinal y la γ -CD (FIGURA 58A), muestra una intensidad de absorción apreciable con una banda bien definida y el máximo de absorción situado a 375 nm, ligeramente desplazado con respecto a lo que se observa en los complejos con β -CD.

La FIGURA 58B muestra los espectros de excitación y de emisión fluorescente del citado complejo. La intensidad de emisión es ligeramente superior a la detectada para los complejos con α -CD pero significativamente inferior a las de la β -CD e HP β -CD.

El **complejo sólido** formado entre el retinal y la γ -CD da lugar a un espectro de absorción UV-VIS con una banda de intensidad elevada (FIGURA 59A) y un máximo situado a 385 nm, dando lugar a una emisión fluorescente cuya intensidad está en relación con la intensidad de la banda de absorción del complejo formado (FIGURA 59B).

Los mencionados espectros de absorción y fluorescencia demuestran la existencia de un complejo de inclusión entre retinal y γ -CD. Dado que la cavidad de la γ -CD es significativamente mayor que la de la β -CD, la inclusión en la γ -CD puede producirse involucrando al anillo de ciclohexeno pero puesto que el tamaño de la cavidad de γ -CD es mayor que el de la β -CD, el retinal se encuentra solubilizado, puesto que está incluido, dando lugar a espectros de absorción UV-VIS de intensidades apreciables pero con libertad para rotar. Si la molécula de retinal no se encuentra constreñida, puede girar desactivándose el estado excitado, lo que explicaría la baja fluorescencia observada en el caso de la γ -CD. La disminución de la intensidad de fluorescencia de este complejo con respecto a la observada para el complejo con β -CD, se explica si se compara la molécula de retinal con la de la prostaglandina $F_{2\alpha}$, una molécula de cadenas etilénicas unida a un

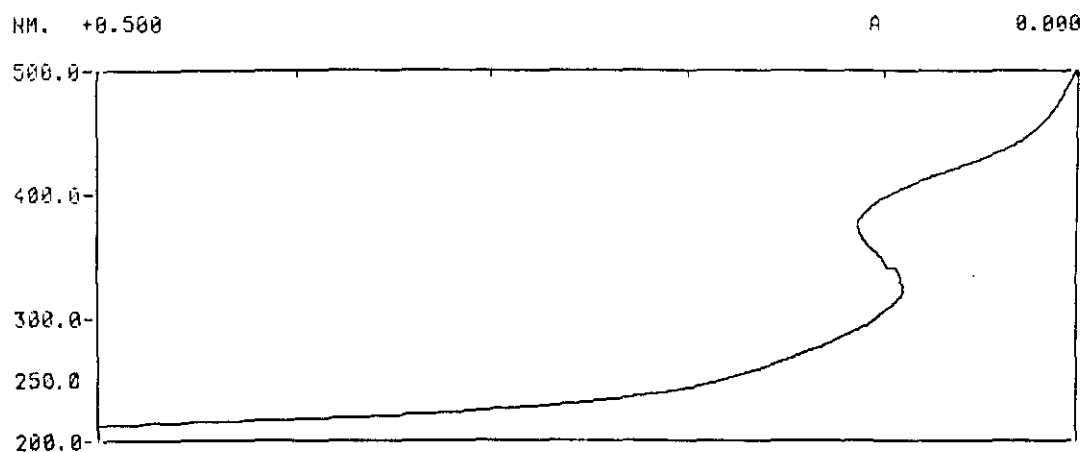


FIGURA 57A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ α -CD (sólido) en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm),

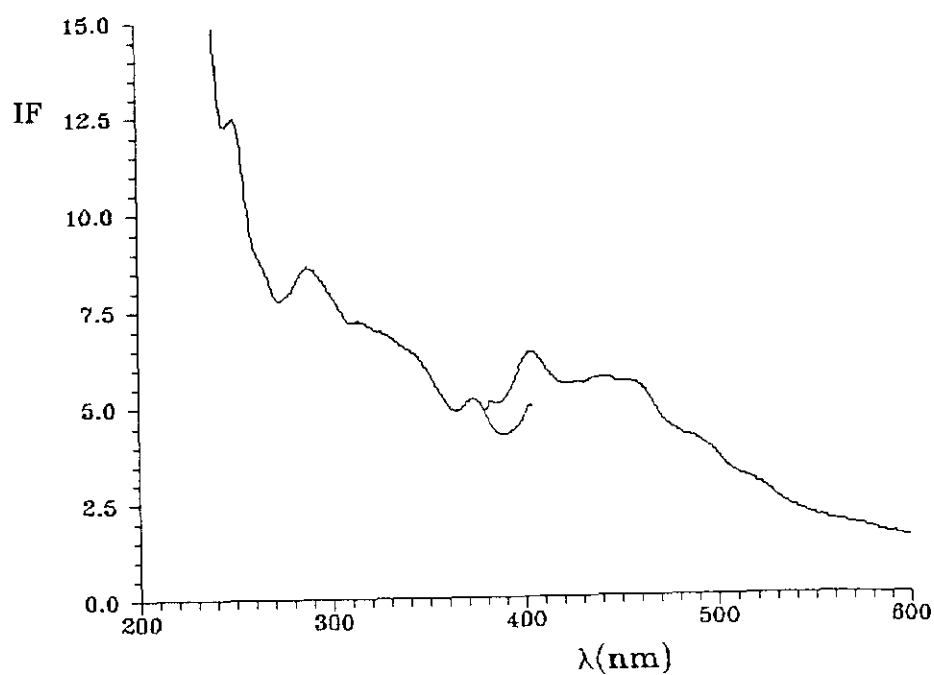


FIGURA 57B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/ α -CD (sólido) en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm),

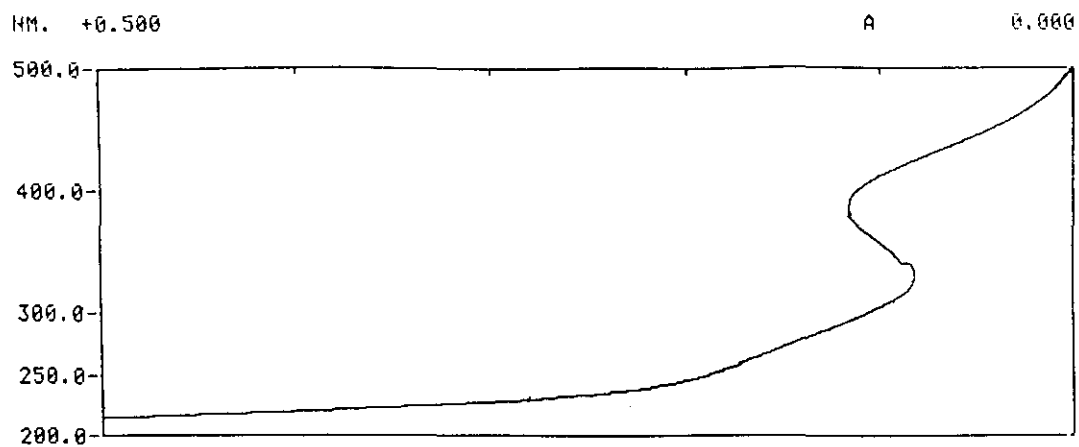


FIGURA 58A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ γ -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

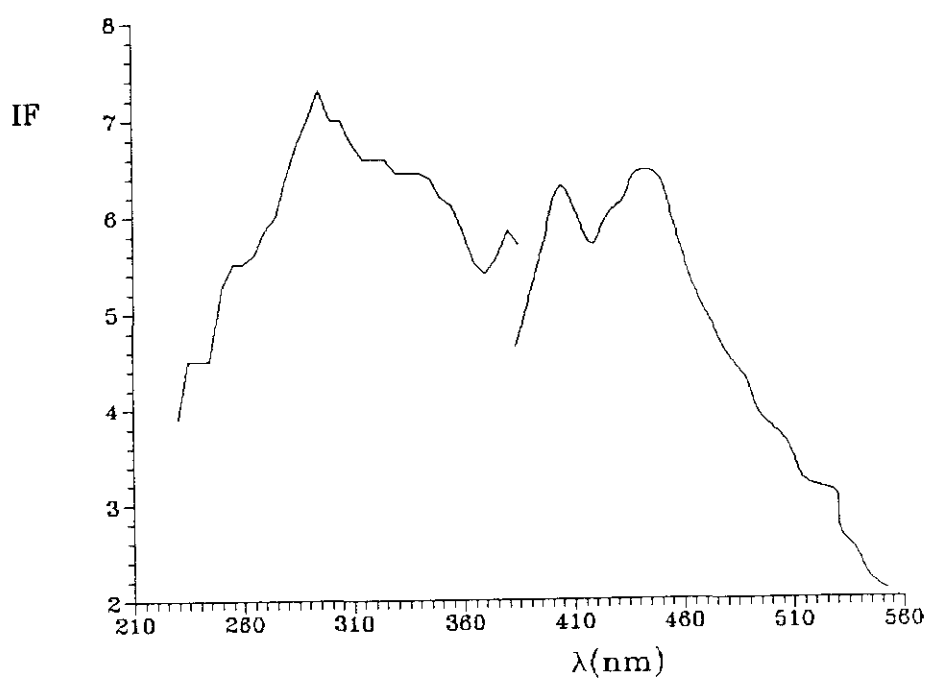


FIGURA 58B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/ γ -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

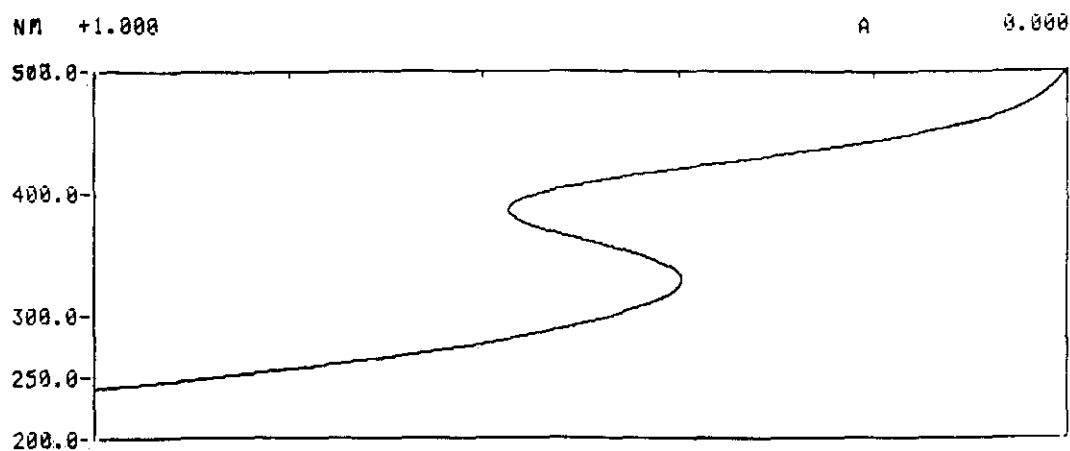


FIGURA 59A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinal/ γ -CD (sólido) en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

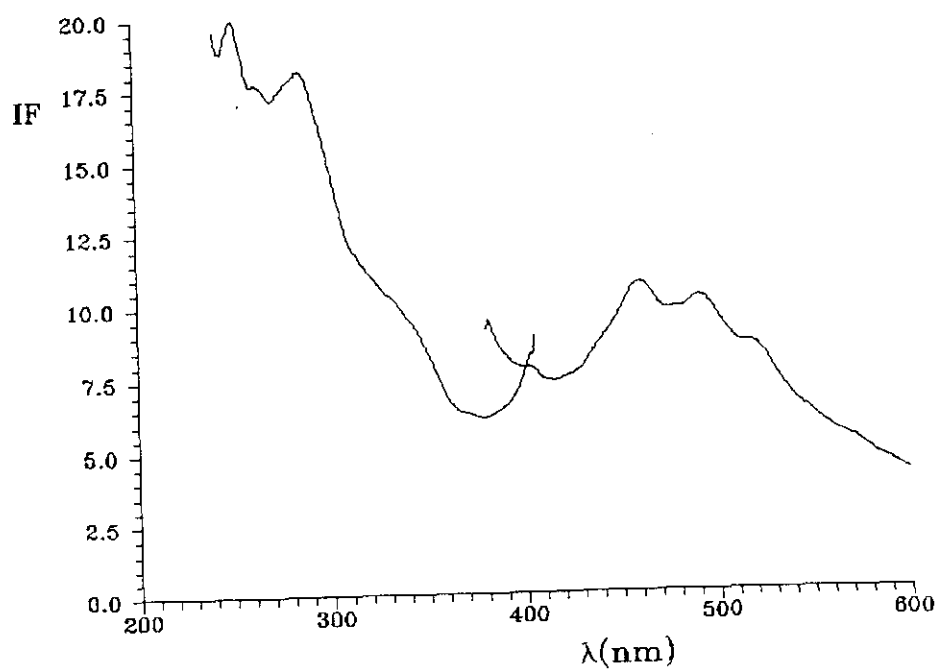


FIGURA 59B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo retinal/ γ -CD (sólido) en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

anillo de ciclopentano, que guarda una cierta similitud con el retinal y forma complejos de inclusión con los distintos tipos de ciclodextrinas con geometrías diferentes, siendo el más favorecido aquel en el que la inclusión se produce con la β -CD.

III.B.1.1.2 13-C/S RETINAL/CICLODEXTRINAS

III.B.1.1.2.1 13-C/S RETINAL/ β -CD

Se obtuvo el complejo de inclusión entre β -CD y este isómero geométrico del *todo-trans* retinal. En la FIGURA 60A, se aprecia la banda de absorción característica del retinal con un máximo a 380 nm, apareciendo también otro pico de absorción a 280 nm, que como ya se ha comentado puede ser debido a la presencia de microcristales. El valor de la absorbancia indica que la solubilización del compuesto es elevada.

Este complejo de inclusión presenta fluorescencia con máximos a $\lambda_{ex} = 335$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm (FIGURA 60B). El desplazamiento que se observa hacia menores longitudes de onda, tanto en el máximo de excitación como de emisión fluorescente puede deberse a que estos espectros de fluorescencia se obtuvieron con el espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo MPF-2A. Por ello se puede considerar que las características espectrofluorimétricas de este complejo son las mismas que las del complejo del retinal *todo-trans*.

III.B.1.1.2.2 13-C/S RETINAL/HPBCD

El espectro de absorción de este complejo en solución acuosa presenta la banda característica del retinal muy bien definida y estrecha, con un máximo a $\lambda_{max} = 385$ nm (FIGURA 61A). Su perfil espectral recuerda notablemente a los espectros de absorción de estos compuestos, cuando están disueltos en solventes orgánicos, lo que indica que la fracción de producto solubilizado es elevada.

En la FIGURA 61B se aprecia que la intensidad de fluorescencia desarrollada para este complejo de inclusión es superior a la que se obtiene con el de β -CD como podría esperarse en función de que su espectro de absorción indica que el proceso de inclusión

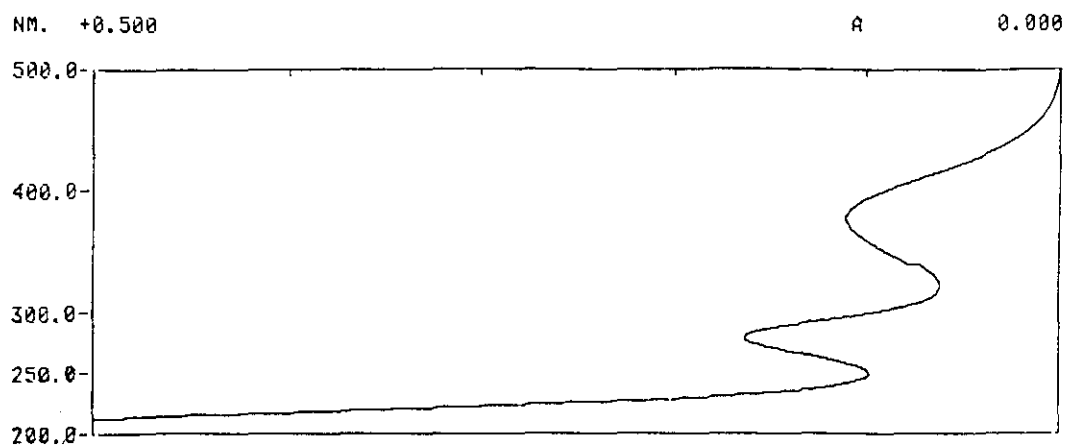


FIGURA 60A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 13-cis retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

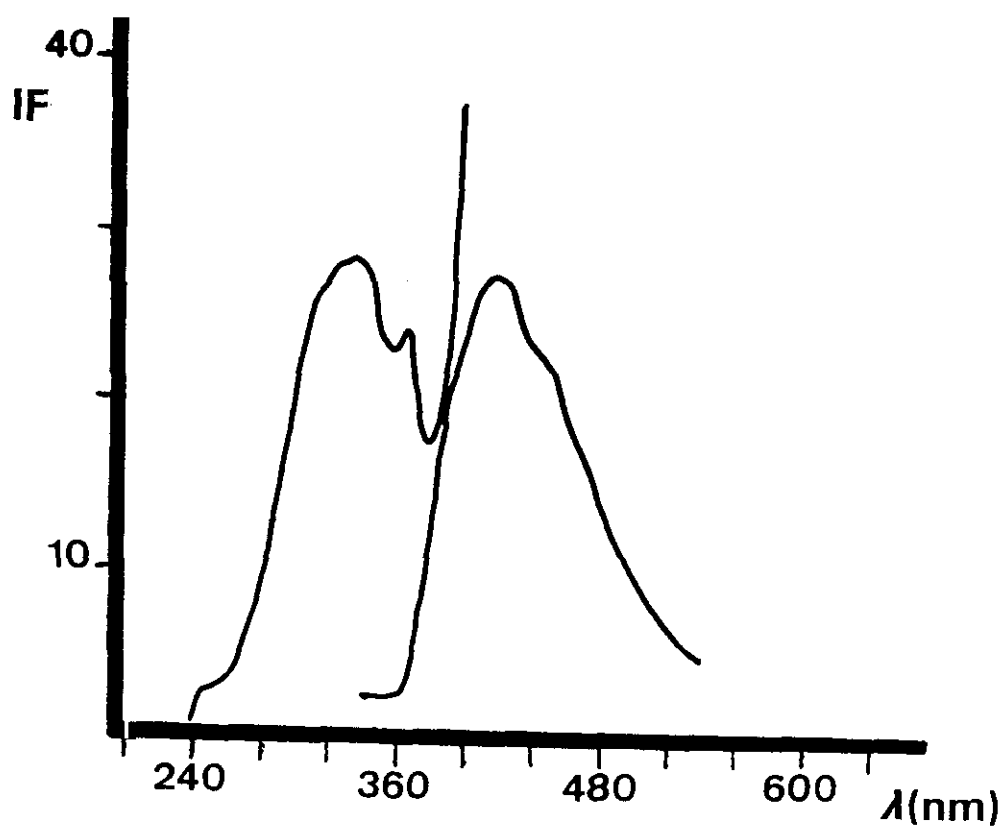


FIGURA 60B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 13-cis retinal/ β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

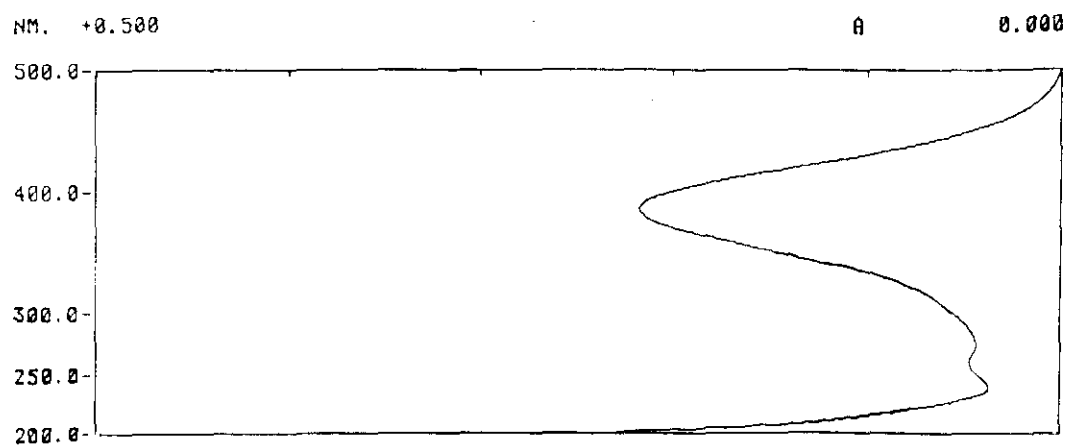


FIGURA 61A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 13-cis retinal/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

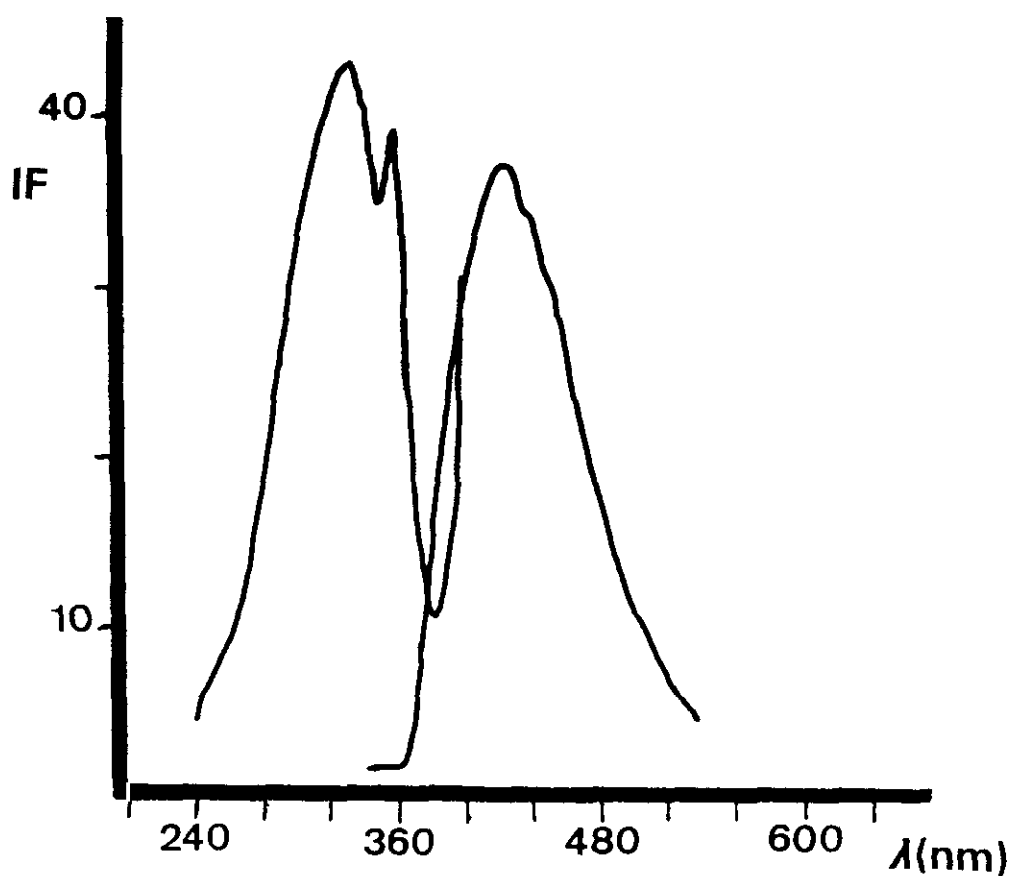


FIGURA 61B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) del complejo 13-cis retinal/HP β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

es más eficaz. Al igual que en el caso de la β -CD, los máximos de excitación y de emisión se encuentran ligeramente desplazados a $\lambda_{ex} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm.

III.B.1.1.2.3 13-C/S RETINAL/DM β -CD Y TM β -CD

El comportamiento de estos complejos de inclusión es muy semejante al descrito para el isómero *todo-trans*. Así pues, la DM β -CD parece producir una pequeña solubilización de la molécula (FIGURA 62A), mientras que la TM β -CD origina un espectro de absorción UV-VIS donde es difícil distinguir el perfil característico de la molécula incluida y lo que se aprecia es debido en gran parte a la dispersión (FIGURA 63A).

Por el contrario, ambos complejos de inclusión producen los espectros de fluorescencia característicos del complejo (FIGURAS 62B y 63B), con máximos localizados a $\lambda_{ex} = 335$ nm y $\lambda_{em} = 420$ nm. En ambos casos, la banda de emisión es más ancha y asimétrica que en el caso de los complejos con HP β -CD y β -CD. Asimismo, la intensidad de emisión del complejo con TM β -CD es ligeramente menor que en el caso de la DM β -CD.

III.B.1.1.2.4 13-C/S RETINAL/ α -CD

El complejo con α -CD muestra la banda de absorción característica del retinal con una absorbancia baja (FIGURA 64A). Sin embargo muestra el perfil característico a diferencia de lo que se produce normalmente en el caso de la α -CD.

Este complejo presenta fluorescencia con características propias del complejo de inclusión (FIGURA 64B) pero más débil que lo que se aprecia para los complejos con β -CD y análogos.

III.B.1.1.2.5 13-C/S RETINAL/ γ -CD

En la FIGURA 65A se presenta el espectro de absorción UV-VIS del complejo de inclusión formado, pudiéndose detectar una banda ancha con un máximo a 385 nm, como habitualmente se observa en el caso de la γ -CD. La banda de absorción es ancha pero está bien definida por lo que la molécula incluida debe estar apreciablemente solubilizada. En

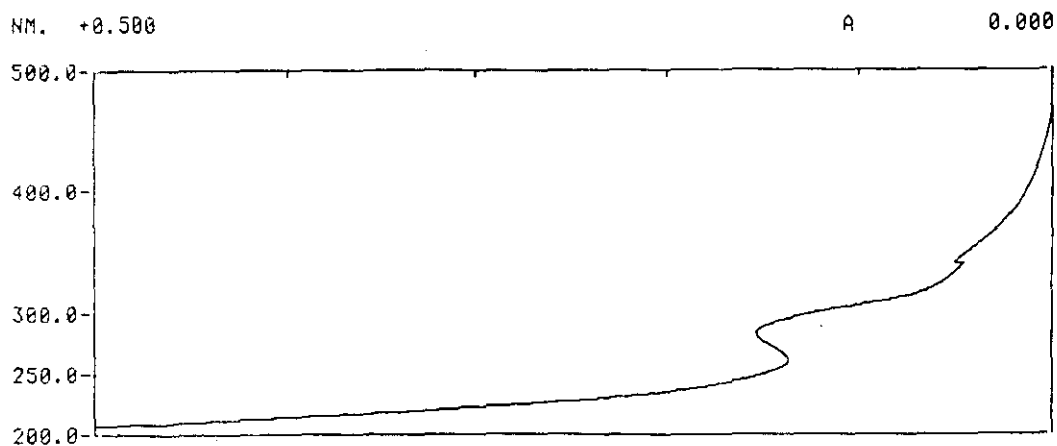


FIGURA 62A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 13-cis retinal/DMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

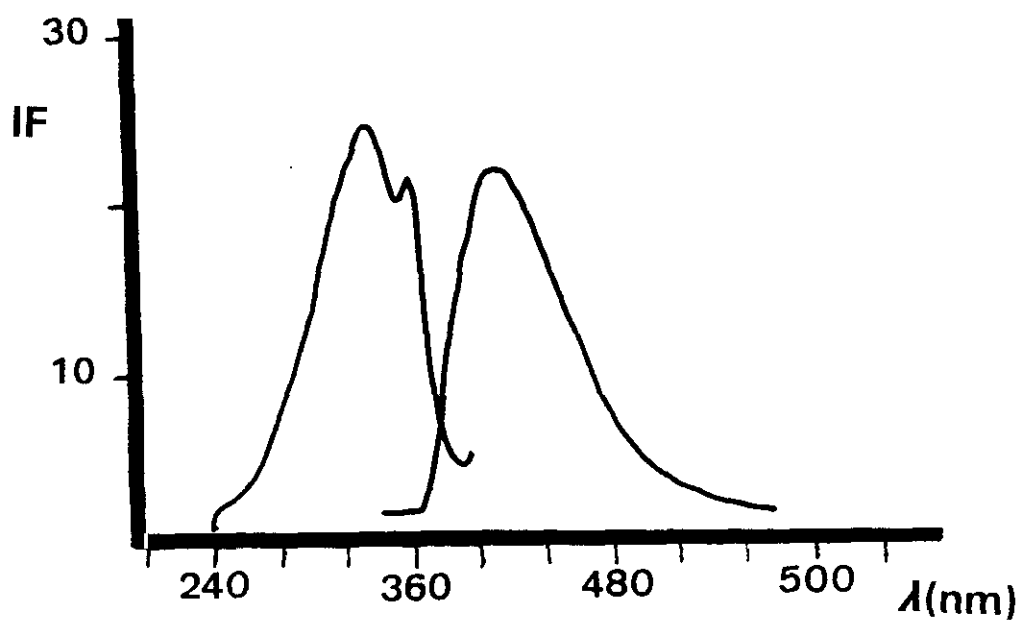


FIGURA 62B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 13-cis retinal/DMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

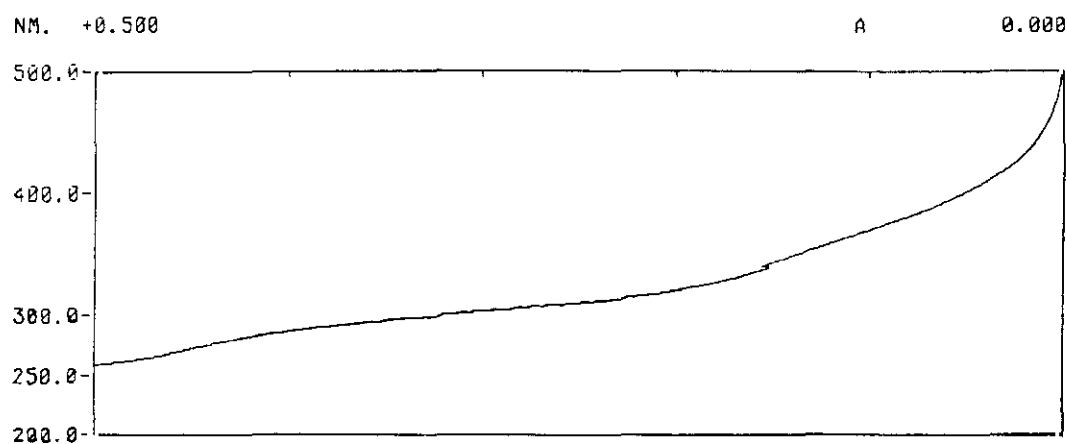


FIGURA 63A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 13-cis retinal/TMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

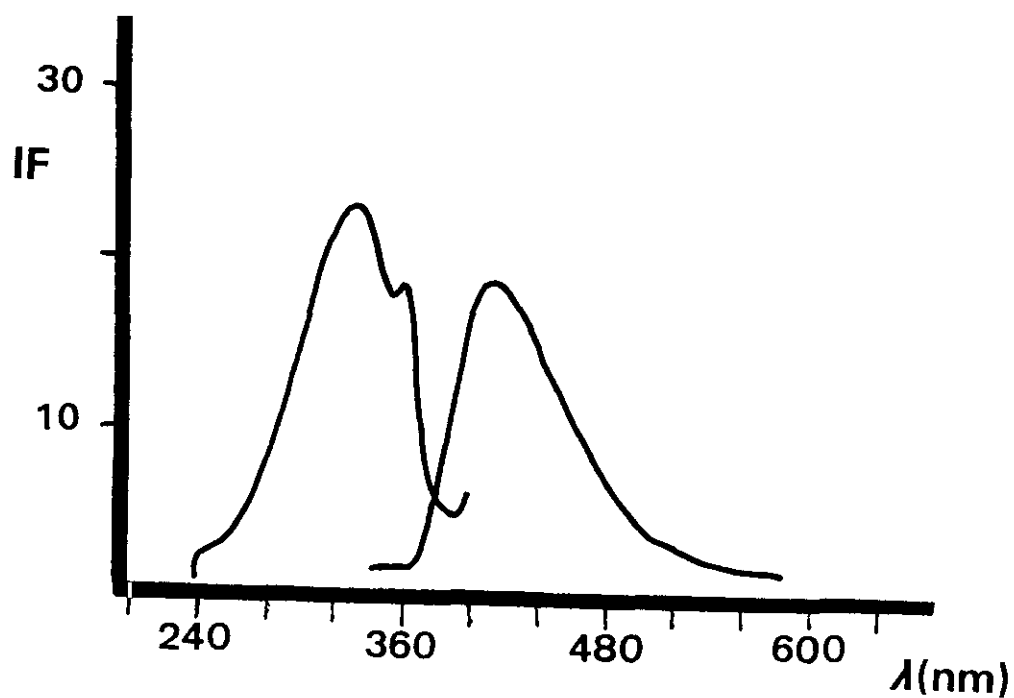


FIGURA 63B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335 \text{ nm}$) del complejo 13-cis retinal/TMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

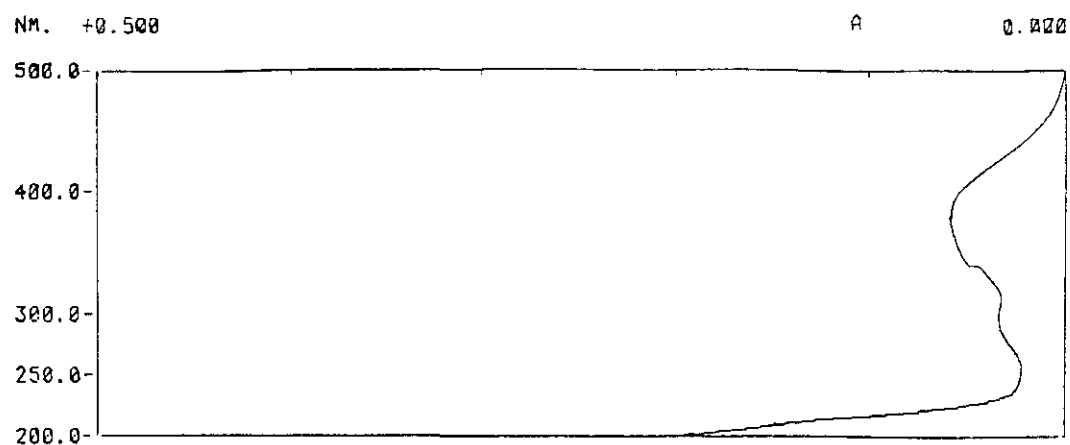


FIGURA 64A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 13-cis retinal/ α -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

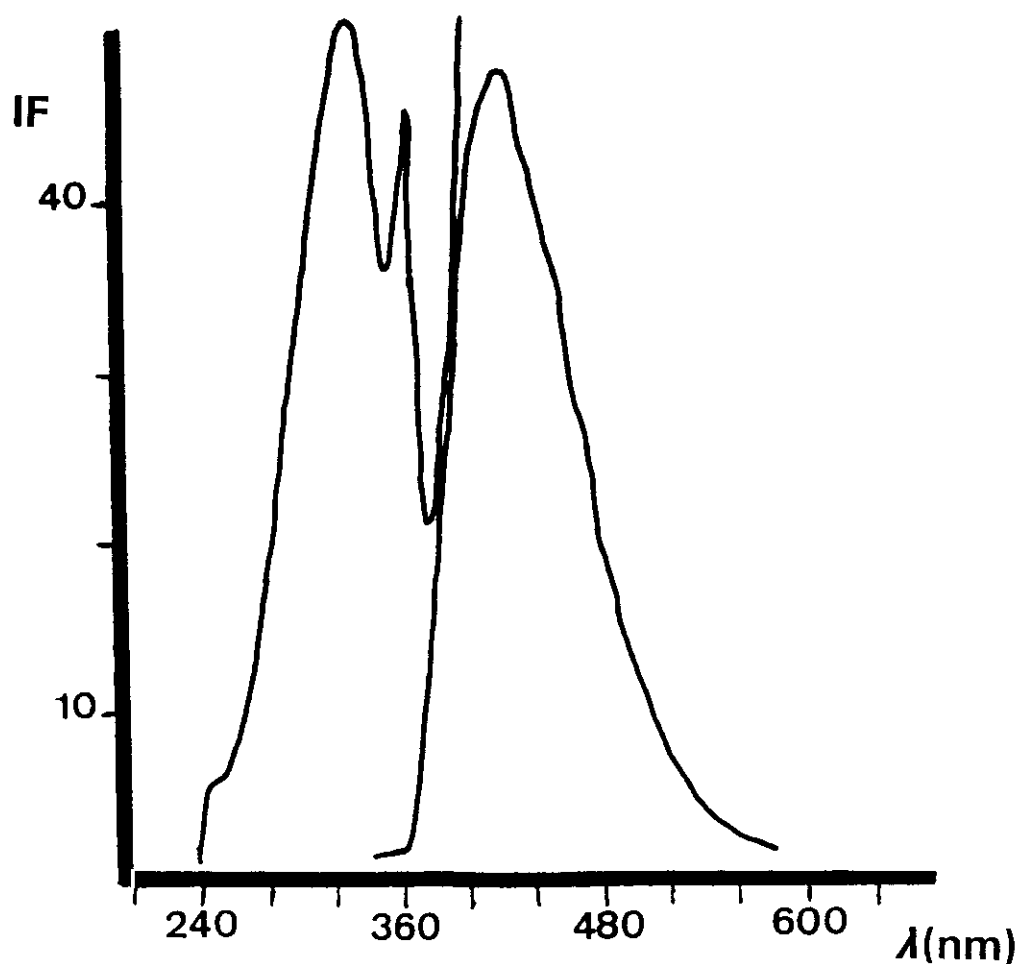


FIGURA 64B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 13-cis retinal/ α -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

los espectros de excitación y emisión fluorescente, no aparecen modificaciones significativas que sean dignas de mención (FIGURA 65B).

III.B.1.1.3 9-C/S RETINAL/CICLODEXTRINAS

III.B.1.1.3.1 9-C/S RETINAL/ β -CD

El espectro de absorción UV-VIS del complejo de inclusión de este isómero (FIGURA 66A) guarda una gran similitud en cuanto a perfil, posición de los máximos e intensidad de absorción, con lo descrito para el isómero 13-*cis*. En este caso, el máximo correspondiente a la región visible de absorción del complejo aparece a 375 nm. Este desplazamiento hipsocrómico con respecto al complejo todo-*trans* retinal/ β -CD puede deberse a que el 9-*cis* retinal disuelto en solventes orgánicos presenta un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción con respecto al todo-*trans* retinal y ese mismo tipo de desplazamiento podría observarse tras la formación del complejo de inclusión.

Los máximos de excitación y emisión fluorescente aparecen a $\lambda_{ex} = 310$ y 335 nm y $\lambda_{em} = 430$ nm (FIGURA 66B). La intensidad de emisión es de magnitud semejante a la que se observa para complejo 13 *cis*-retinal/ β -CD.

III.B.1.1.3.2 9-C/S RETINAL/HP β -CD

A diferencia de los otros isómeros de retinal, para los cuales el proceso de inclusión en HP β -CD es muy favorable, en el caso del 9-*cis* la inclusión con esta ciclodextrina es muy difícil. El espectro de absorción UV-VIS de este complejo (FIGURA 67A) si bien muestra la banda de absorción del retinal, su perfil espectral no es característico del mismo, no quedando de forma definida la banda de 380 nm. Si en esta experiencia la solubilización del compuesto con esta ciclodextrina no es eficaz como en otros casos, podría ser debido a que la inclusión estuviera dificultada debido a los problemas de impedimento estérico como consecuencia de las interacciones entre los grupos hidroxipropilo de la ciclodextrina y la geometría de la molécula que se quiere incluir.

Los espectros de fluorescencia muestran características muy semejantes a las descritas para la β -CD (FIGURA 67B), si bien en este caso la intensidad de fluorescencia

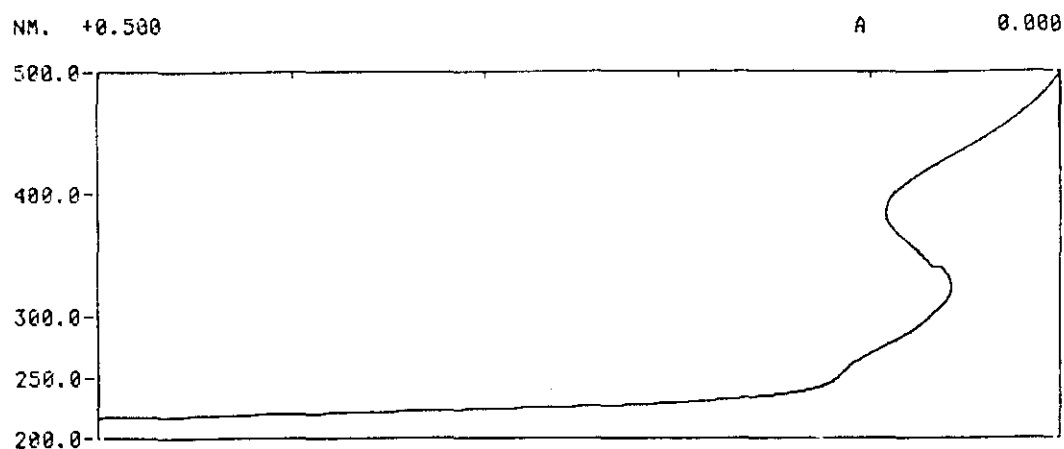


FIGURA 65A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 13-cis retinal/ γ -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

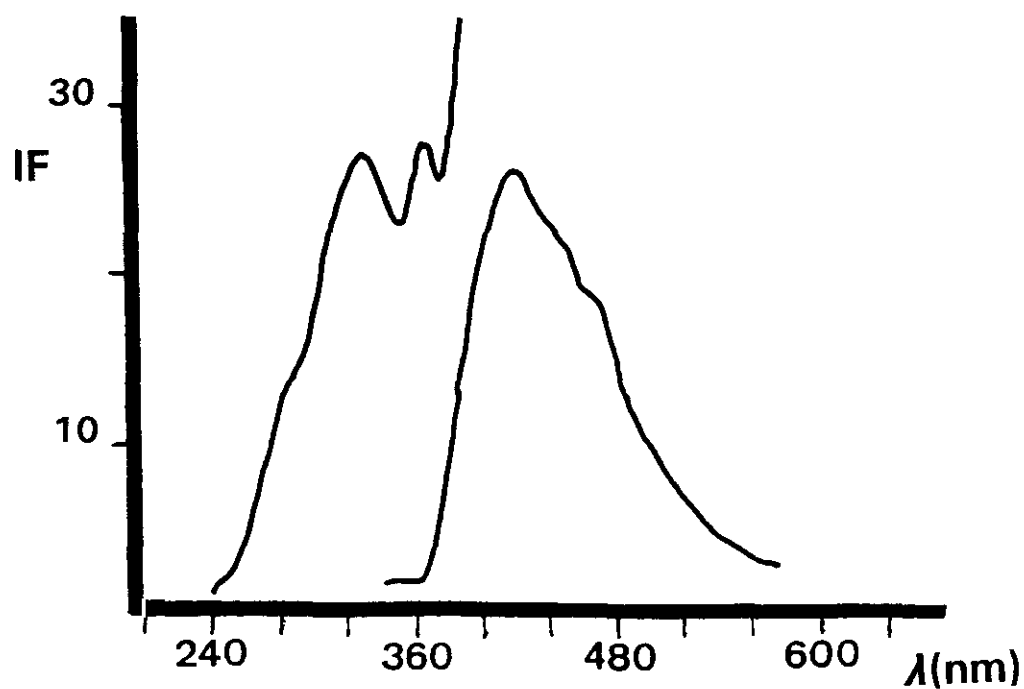


FIGURA 65B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 13-cis retinal/ γ -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

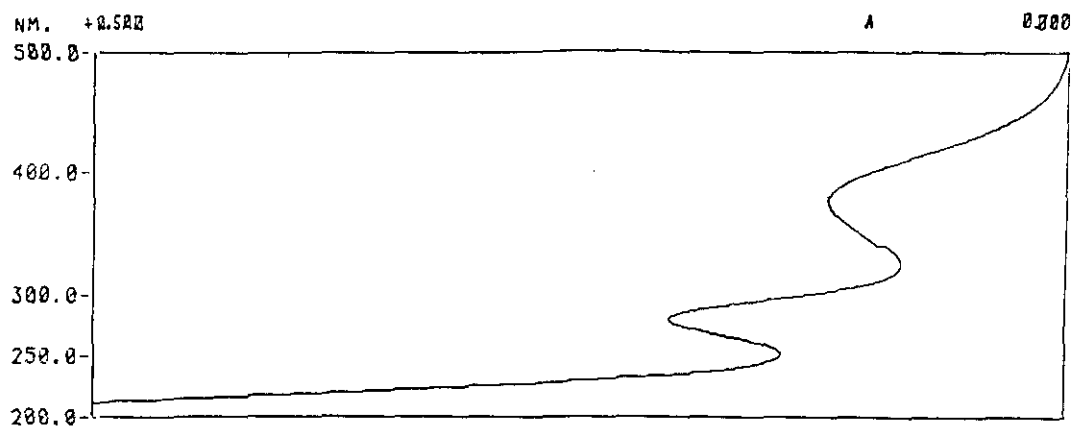


FIGURA 66A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 9-cis retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

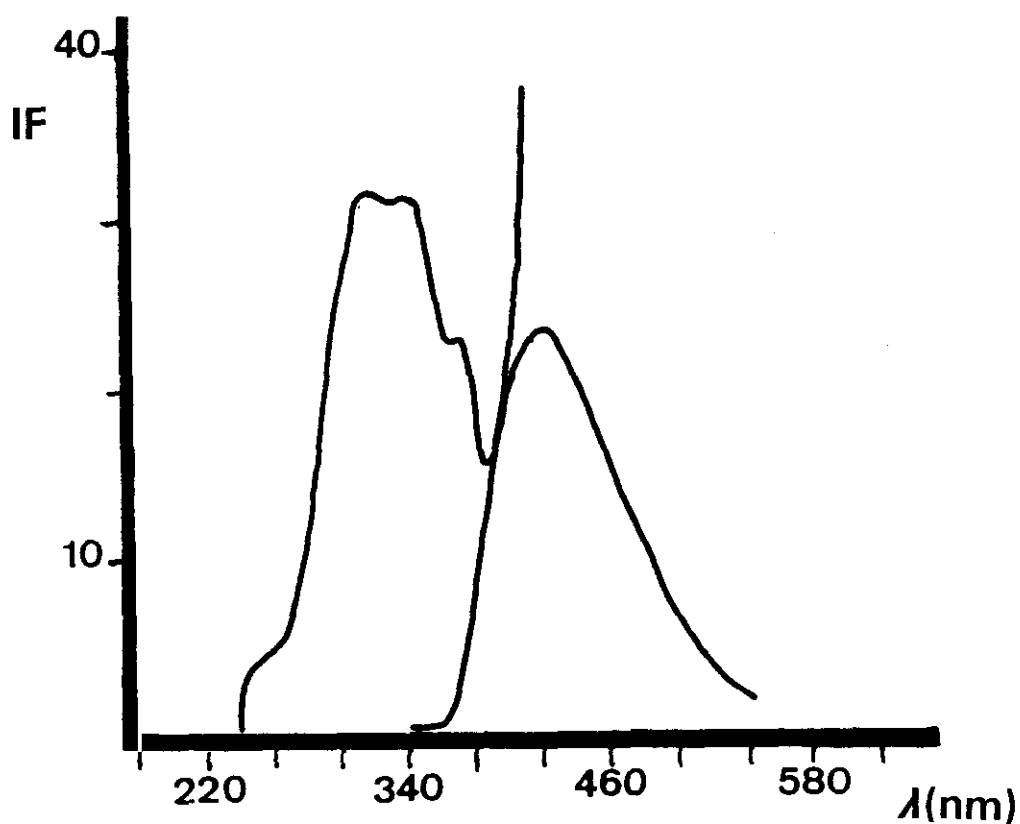


FIGURA 66B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) del complejo 9-cis retinal/ β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

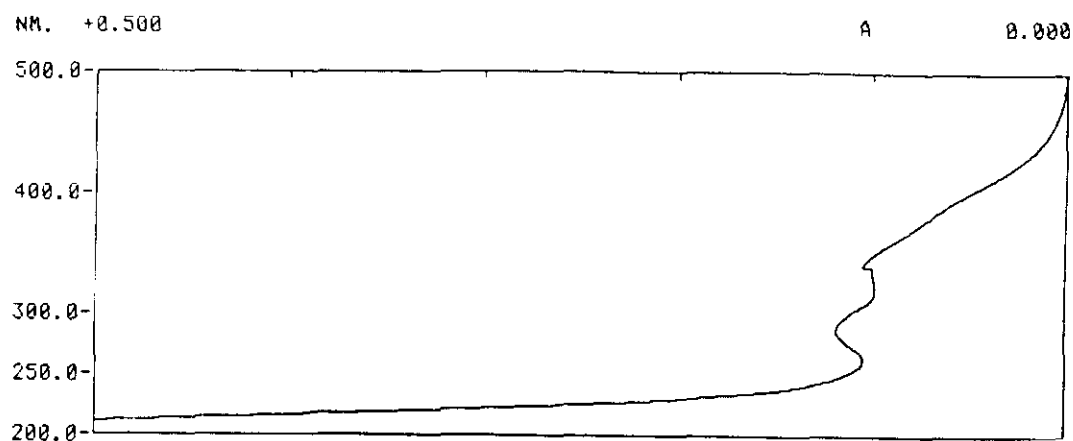


FIGURA 67A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 9-cis retinal/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

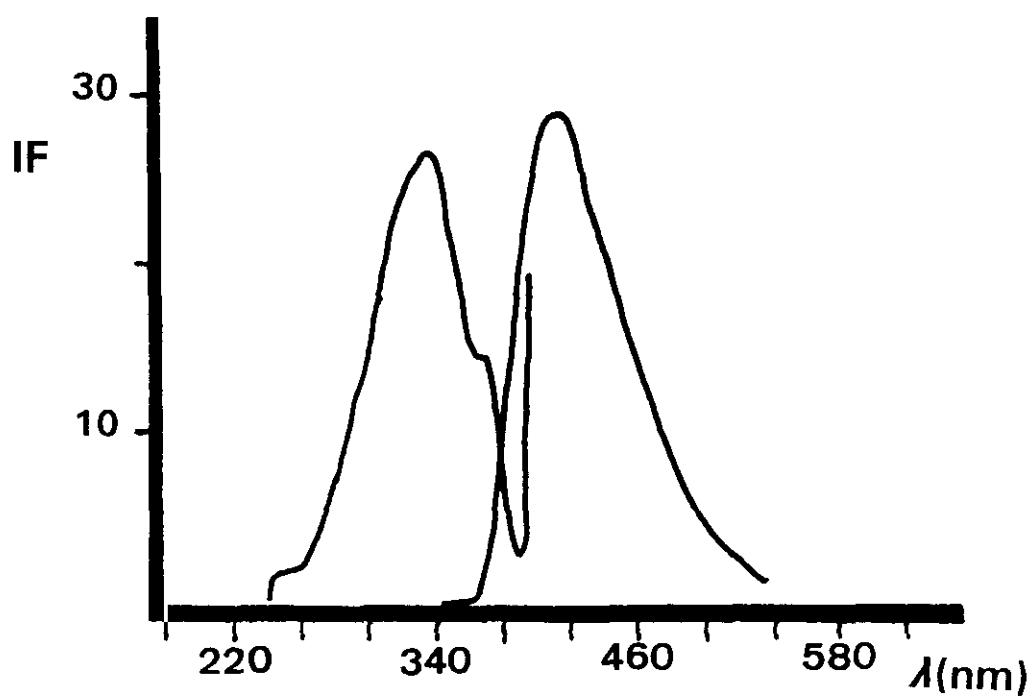


FIGURA 67B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 9-cis retinal/HP β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

es ligeramente superior a la que se observa para el complejo con β -CD. Esta mayor intensidad de emisión puede atribuirse a fenómenos de dispersión de la luz debido a que al no ser la solubilización completamente eficaz, persisten partículas en suspensión, bien del retinal, bien del complejo.

III.B.1.1.3.3 9-C/S RETINAL/DM β -CD Y TM β -CD

Los espectros de absorción UV-VIS de los complejos de 9-*cis* retinal con estas ciclodextrinas modificadas se presentan en las FIGURAS 68A y 69A. El complejo de inclusión con DM β -CD exhibe en el espectro de absorción la banda con un máximo a 280 nm y sin embargo el máximo a 380 nm no aparece de forma clara sino englobado en la banda de 280 nm. Contrariamente a lo que sucede en los isómeros anteriormente descritos, la TM β -CD forma un complejo de inclusión con el 9-*cis* retinal, que presenta la banda de absorción característica de 380 nm y buenas características de solubilidad. También aparece la banda de 280 nm.

De todas las experiencias realizadas con los distintos retinoides, este es el único caso donde se origina la banda de absorción característica de la molécula solubilizada con la TM β -CD. Podría pensarse que dadas las características geométricas de este isómero y la sustitución de esta β -CD modificada, el proceso de inclusión se conduzca de distinta forma a lo habitual. Así, podría suponerse que el extremo polar junto con la cadena podría incluirse en la cavidad de la ciclodextrina dando lugar a una buena solubilización. Sin embargo la señal de fluorescencia no es tan elevada como cabría esperarse, de acuerdo con el espectro de absorción (FIGURA 69B) debido a que si fuera la cadena la parte incluida de la molécula, ésta estaría solubilizada pero con posibilidad de rotar en el interior de la ciclodextrina, conduciendo a la desactivación del estado excitado.

Los espectros de excitación y de emisión fluorescente del complejo obtenido con la DM β -CD (FIGURA 68B) presentan máximos a $\lambda_{\text{ex}} = 335$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 420$ nm, al igual que en el caso de la TM β -CD. Dado que se obtiene una señal de fluorescencia adecuada y puesto que los complejos de inclusión con DM β -CD en el caso de otros retinoides conducen a una buena solubilización de la molécula, podemos afirmar que el 9-*cis* retinal se incluye en la cavidad de esta ciclodextrina, tal vez por el extremo polar de la cadena,

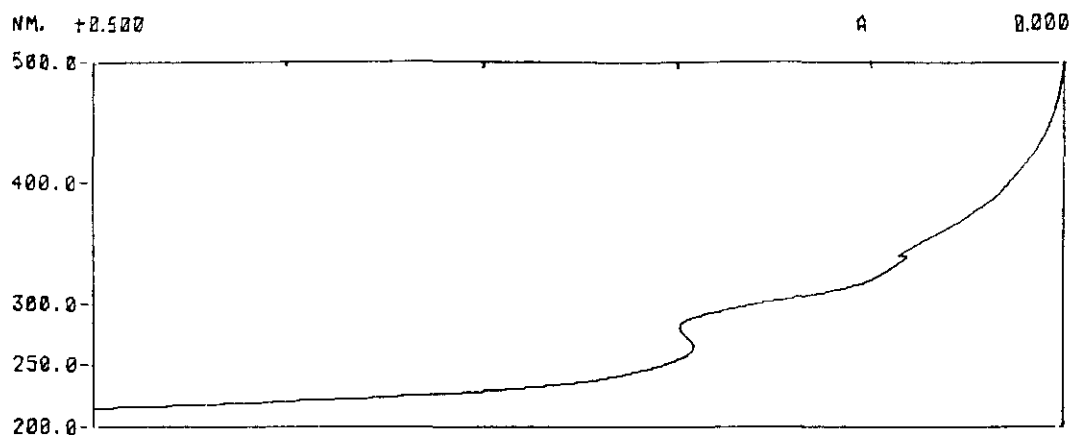


FIGURA 68A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 9-cis retinal/DM β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

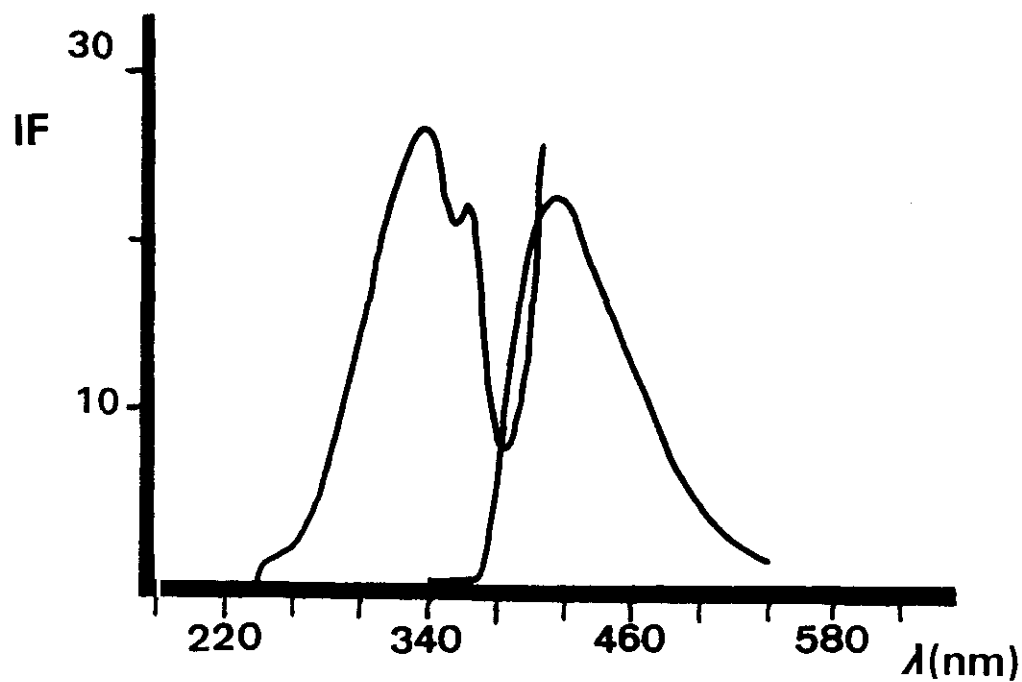


FIGURA 68B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 9-cis retinal/DM β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

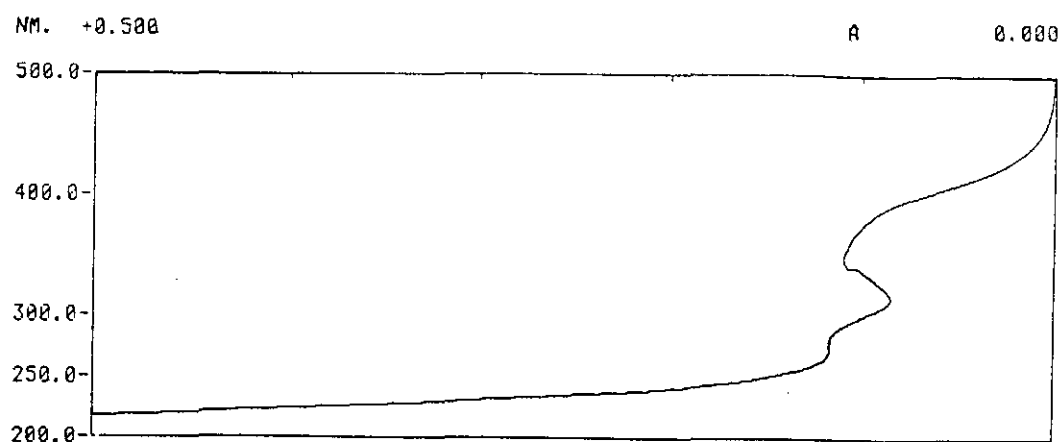


FIGURA 69A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 9-cis retinal/TMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

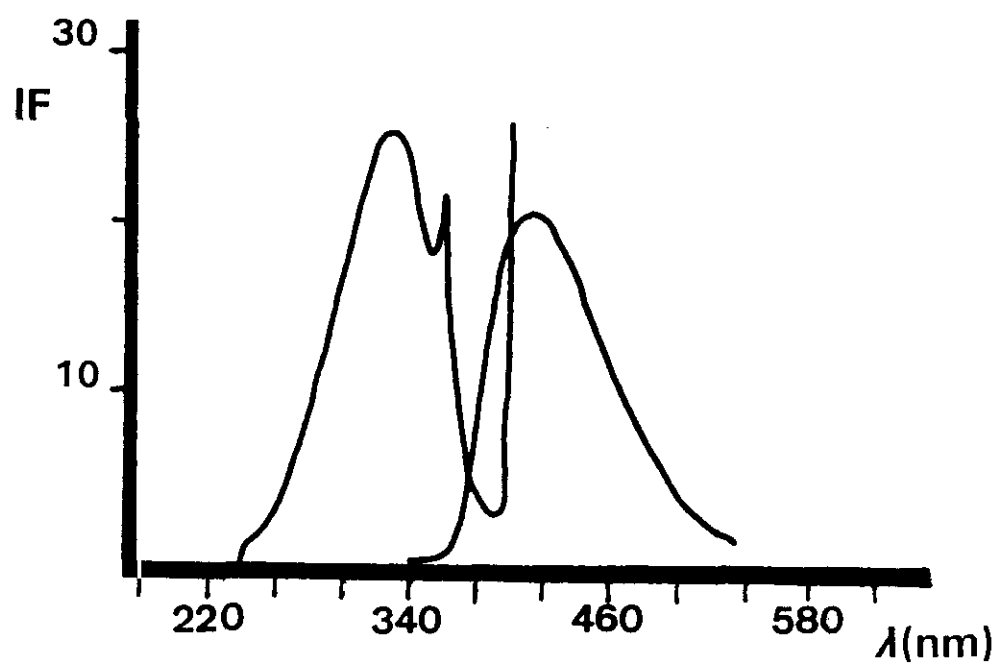


FIGURA 69B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 9-cis retinal/TMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

pero ignoramos la razón por la cual el espectro de absorción no indica una solubilización adecuada de la molécula.

Para explicar el comportamiento del 9-*cis* retinal con la DM β -CD y la TM β -CD, podrían asimismo hacerse consideraciones de polaridad, si suponemos que es el extremo polar y parte de la cadena los que se incluyen en la cavidad de la ciclodextrina. Así pues, teniendo en cuenta que la cavidad de la DM β -CD aloja mejor a moléculas hidrofóbicas que la TM β -CD, el extremo polar del 9-*cis* retinal sería más difícilmente incluido por la DM β -CD que por la TM β -CD, lo que explicaría su comportamiento con respecto a la absorción.

III.B.1.1.3.4 9-C/S RETINAL/ α -CD

A diferencia de lo que sucede generalmente con otros retinoides, en el caso de la α -CD el espectro de absorción UV-VIS del complejo con el 9-*cis* retinal (FIGURA 70A), muestra la banda de absorción característica de la molécula solubilizada, con un perfil espectral definido, si bien la absorbancia obtenida es relativamente baja. Igualmente en este caso y en concordancia con lo que se observa en el espectro de absorción, los espectros de excitación y emisión fluorescente (FIGURA 70B) exhiben una fluorescencia apreciable. Los máximos de excitación y emisión fluorescente se presentan como en el caso de las otras ciclodextrinas, a $\lambda_{ex} = 335$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm.

En esta ciclodextrina se observa con dificultad fluorescencia para los otros isómeros y retinoides estudiados. Para ellos se ha supuesto que el retinal entra en el caso de la α -CD por el extremo polar y no por el anillo de ciclohexeno ya que la cavidad de la ciclodextrina es demasiado pequeña para que entre el anillo. En el todo-*trans* retinal y en el 13-*cis* retinal si entra el extremo de la cadena, la salida de la molécula debe también producirse fácilmente. Por ello no se observa en los espectros de absorción la banda característica de 380 nm, ya que en la misma medida que entra la molécula se produce su salida. Sin embargo la geometría de la molécula de 9-*cis* retinal condiciona un comportamiento peculiar en el caso de la α -CD y la TM β -CD. Si nos centramos en los resultados experimentales obtenidos para la α -CD, podemos pensar que el 9-*cis* retinal entra en la cavidad de la ciclodextrina a través de la cadena y el extremo polar, y que esta unión es estable, a diferencia de los otros retinoides de disposición todo-*trans*, debido a que la molécula de 9-*cis* retinal "se dobla" por el enlace central de la cadena etilénica, pudiendo

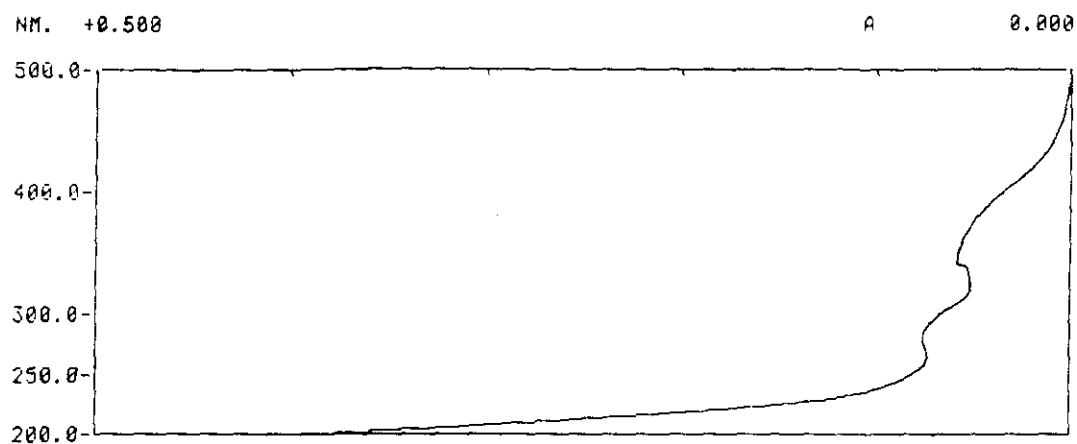


FIGURA 70A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 9-cis retinal/ α -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

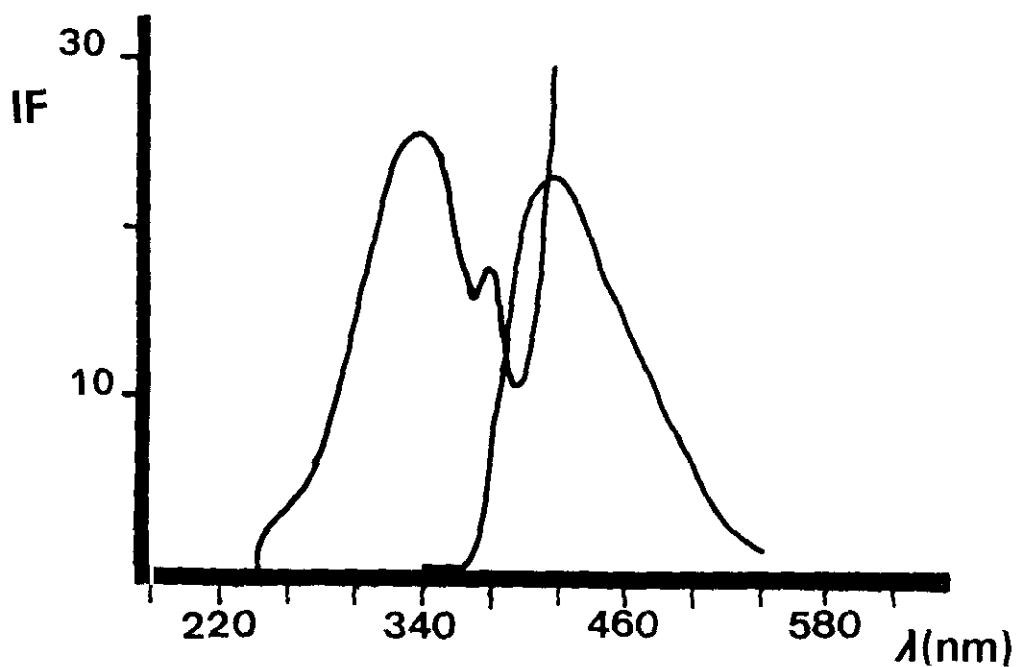


FIGURA 70B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 9-cis retinal/ α -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

quedar el anillo ciclohexénico adherido a la superficie externa de la ciclodextrina y estabilizarse de este modo el complejo. Este mismo hecho impide su rotación y permite observar fluorescencia en el caso de la α -CD a diferencia de los otros retinoides (FIGURA 71).

III.B.1.1.3.5 9-C/S RETINAL/ γ -CD

El espectro de absorción UV-VIS de este complejo de inclusión (FIGURA 72A) muestra un perfil espectral no bien definido. La banda de absorción del 9-*c/s* retinal tiene un valor de absorbancia inferior al que se obtiene para la α -, β - e HP β -CD.

Los espectros de excitación y emisión fluorescente presentan los máximos característicos a $\lambda_{ex} = 335$ nm y $\lambda_{em} = 420$ nm (FIGURA 72B), la intensidad de emisión es ligeramente superior a la observada en el caso de la α -CD.

Dado que el perfil del espectro de absorción UV-VIS guarda una cierta semejanza con el que se obtiene para la α -CD, podría pensarse en que el modo de inclusión del 9-*c/s* retinal es análogo. Sin embargo, si tenemos en cuenta que la cavidad de la γ -CD es más amplia parece lógico pensar que la inclusión se produzca a través del anillo de ciclohexasano. No obstante, como el impedimento estérico para esta molécula de 9-*c/s* retinal es alto, puede ocurrir que la penetración del anillo en la cavidad de γ -CD no sea completa debido a que la cadena plegada, en este caso por el tamaño de la ciclodextrina, no puede acomodarse a la superficie externa.

III.B.1.1.4 TODO-TRANS ACETATO DE RETINILO/ CICLODEXTRINAS

III.B.1.1.4.1 ACETATO DE RETINILO/ β -CD

El acetato de retinilo muestra un máximo de absorción a 327 nm en hexano (FIGURA 73) y etanol (FIGURA 74). El complejo de inclusión con β -CD presenta el máximo de absorción con un desplazamiento batocrómico muy ligero con respecto a la solución en hexano, situándose a 330 nm (FIGURA 75A). En esta figura se puede apreciar que el máximo de absorción del complejo no es tal, sino que se convierte en un hombro debido a la proximidad de la banda que aparece a 280 nm, y que como en otras ocasiones es

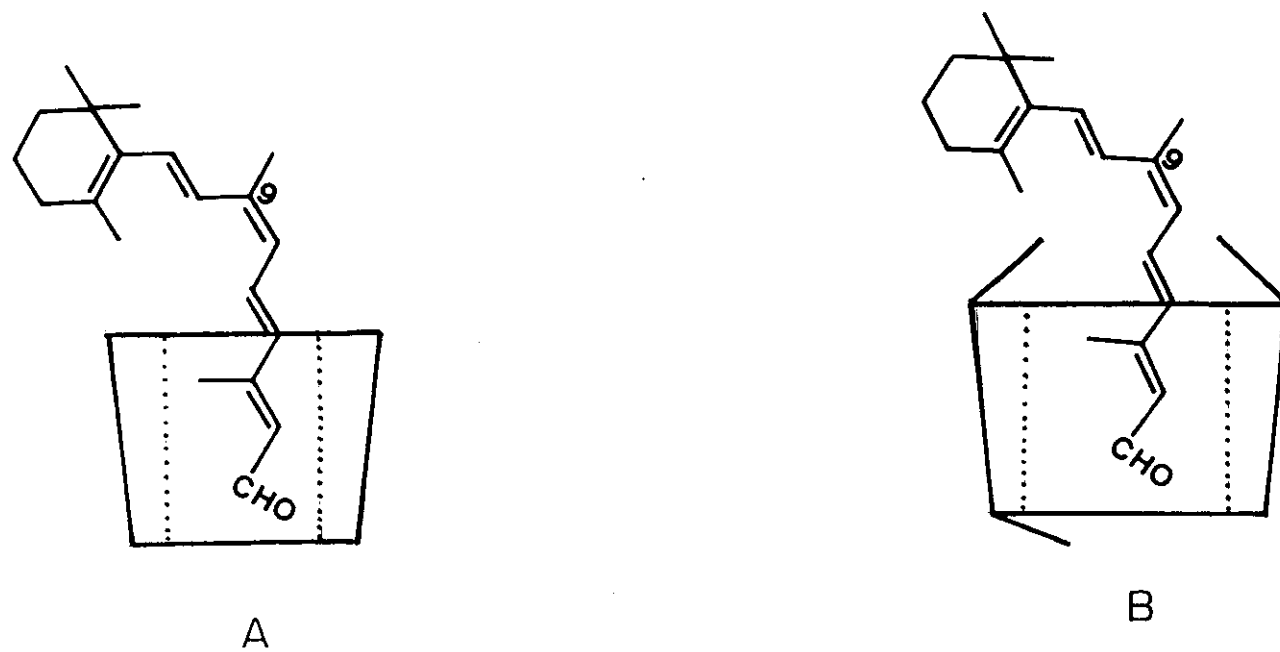


FIGURA 71: Esquema propuesto para los modos de inclusión del 9-cis retinal con: (A) α -CD y (B) TMB-CD.

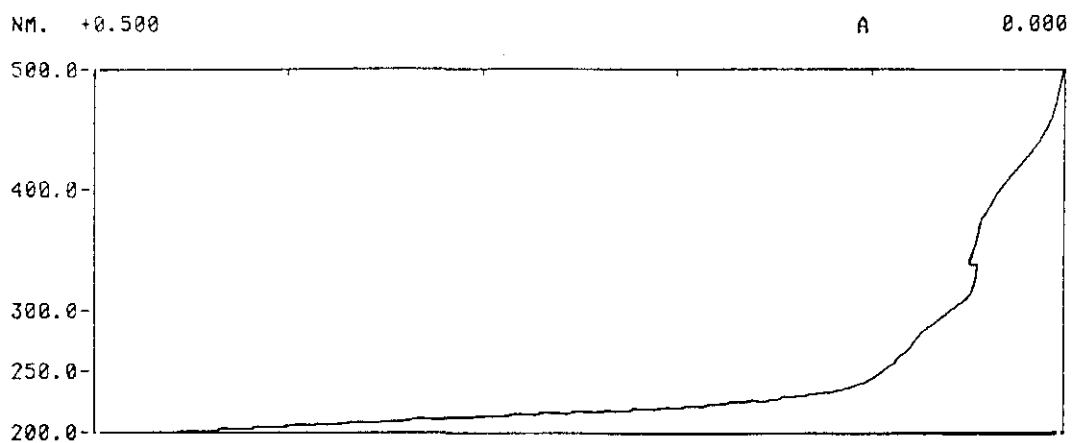


FIGURA 72A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo 9-cis retinal/ γ -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

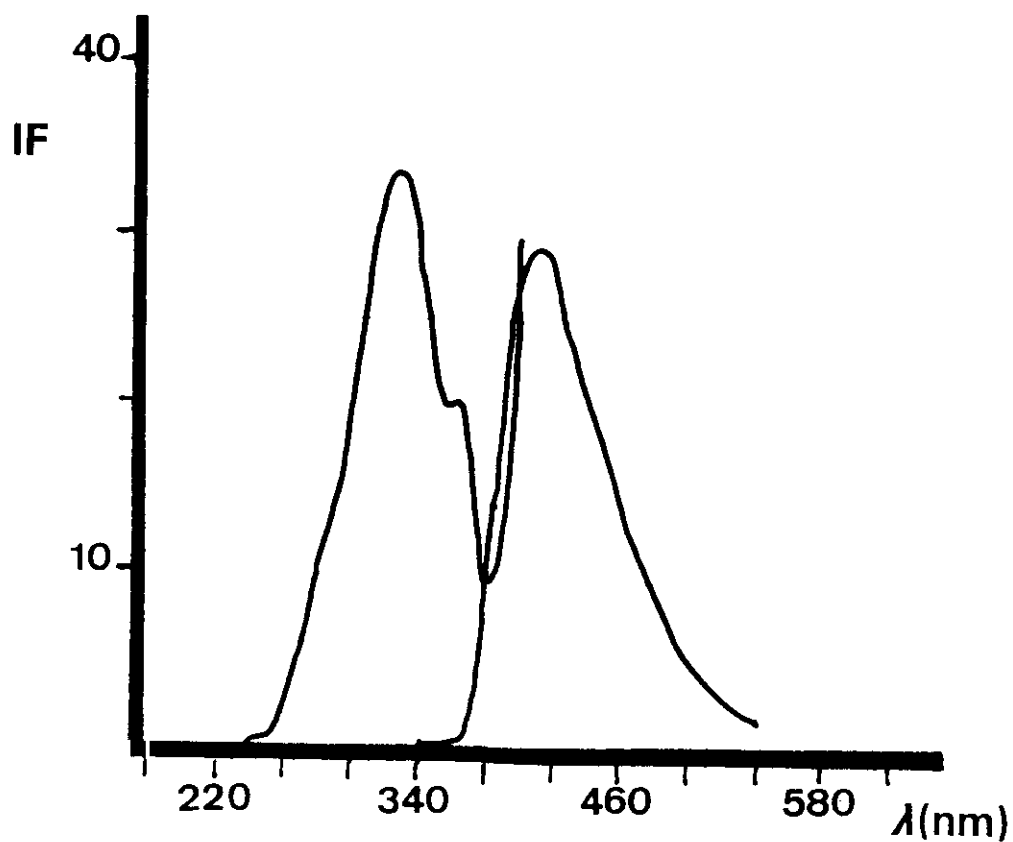


FIGURA 72B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo 9-cis retinal/ γ -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

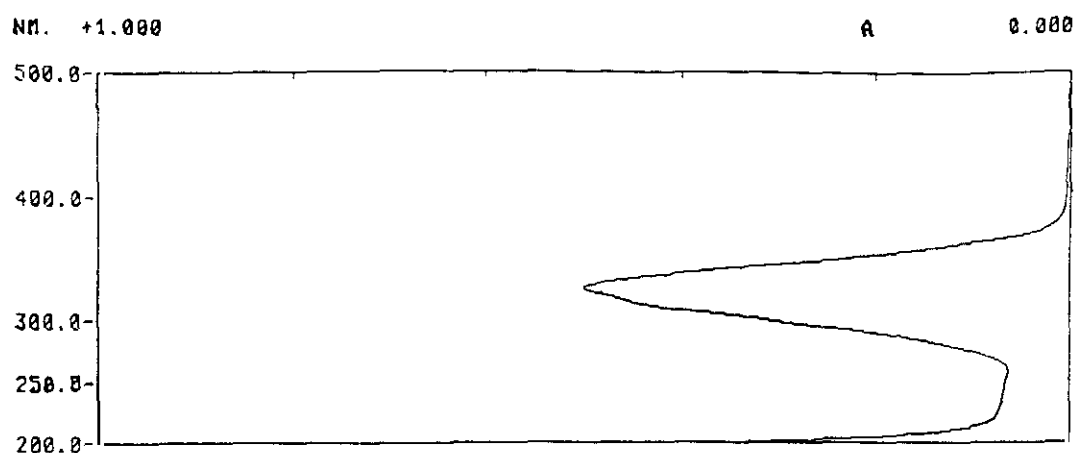


FIGURA 73: Espectro de absorción UV-VIS del acetato de retinilo en hexano. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

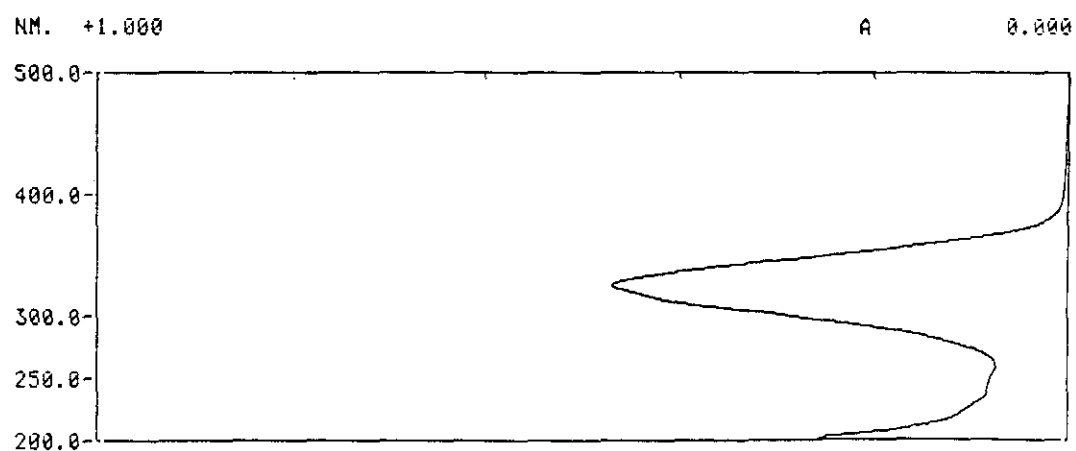


FIGURA 74: Espectro de absorción UV-VIS del acetato de retinilo en etanol. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

atribuible a los agregados microcristalinos, bien del complejo, bien de acetato de retinilo o bien de β -CD presentes en la solución.

Se puede apreciar que en el caso del acetato de retinilo, el perfil de absorción es marcado, pero las absorbancias son más bajas de lo que cabría esperar. En consecuencia parece que la solubilización del acetato de retinilo por la β -CD, comparada con la del retinal es mucho menos eficaz. Si se comparan los valores de las constantes de asociación de los complejos retinal/ β -CD ($\log K = 5'99$) y acetato/ β -CD ($\log K = 4'81$) se puede apreciar que la constante de asociación en el caso del acetato es menor aproximadamente un orden de magnitud y por tanto las absorbancias pueden ser menores.

Paralelamente se obtuvieron los espectros de excitación y emisión fluorescente del complejo acetato de retinilo/ β -CD (FIGURA 75B). El complejo presenta una fluorescencia apreciable probablemente debido a que la molécula de acetato es fluorescente "per se". Los máximos se sitúan a $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 430$ nm. Cabe señalar la aparición, en el espectro de excitación, de un segundo pico a $\lambda_{\text{ex}} = 390$ nm y de un hombro a 460 nm en el espectro de emisión.

III.B.1.1.4.2 ACETATO DE RETINILO/HP β CD

En la FIGURA 76A se presenta el espectro de absorción UV-VIS del complejo obtenido entre el acetato de retinilo y la HP β -CD, en el que se aprecia que la absorbancia de la solución no es alta, lo que indica que la solubilización del compuesto es pequeña. El espectro presenta una banda amplia de absorción situada entre 450 nm y 230 nm con un máximo a 330 nm, si bien en este caso aparecen además otros máximos de absorción a 370 y 400 nm. La resolución de esta banda de absorción sólo se produce para este compuesto y en el caso concreto de esta ciclodextrina. Este comportamiento es repetitivo y se observa la aparición de estos picos, llegando a surgir en algunos casos, cuando la concentración del complejo es elevada, un máximo a 345 nm.

Este comportamiento tan homogéneo no tiene su paralelismo en fluorescencia ya que se obtienen complejos de inclusión que presentando similares características absorciométricas, presentan distintos espectros de fluorescencia. En la FIGURA 76B se recogen los espectros de excitación y de emisión del complejo acetato de retinilo/HP β -CD



FIGURA 75A : Espectro de absorción UV-VIS del complejo acetato de retinilo/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

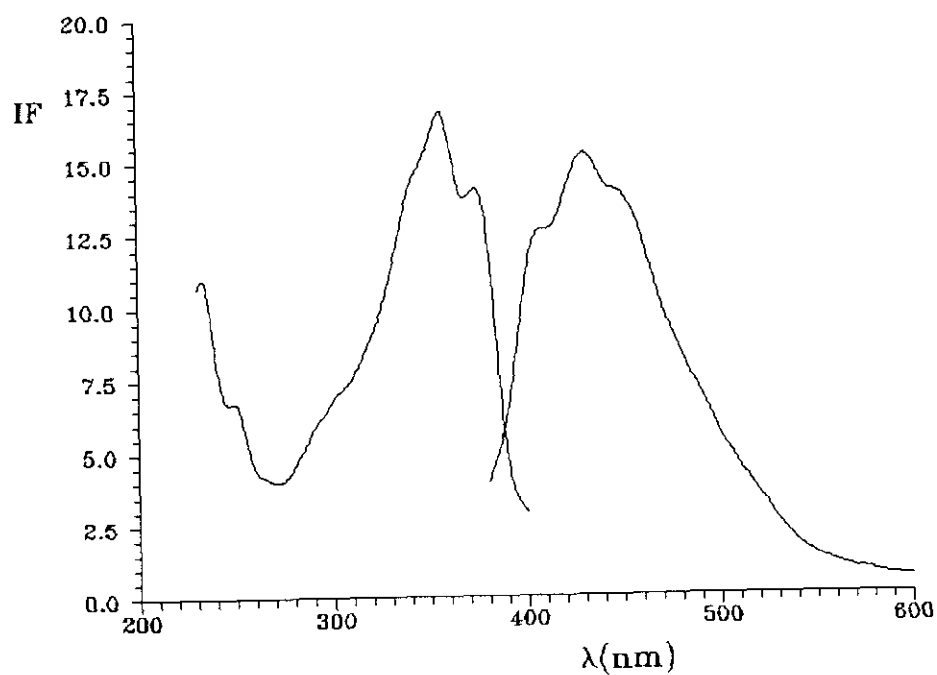


FIGURA 75B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescentes ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo acetato de retinilo/ β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

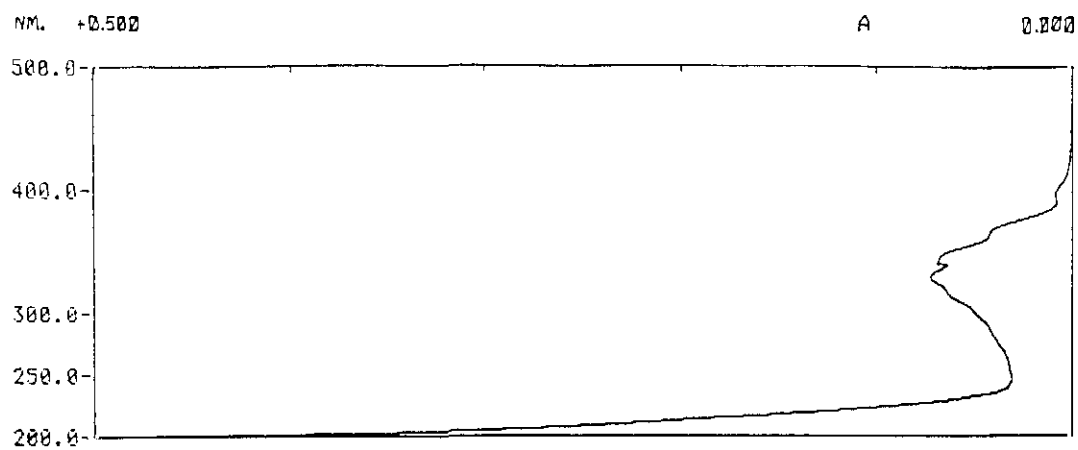


FIGURA 76A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo acetato de retinilo/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

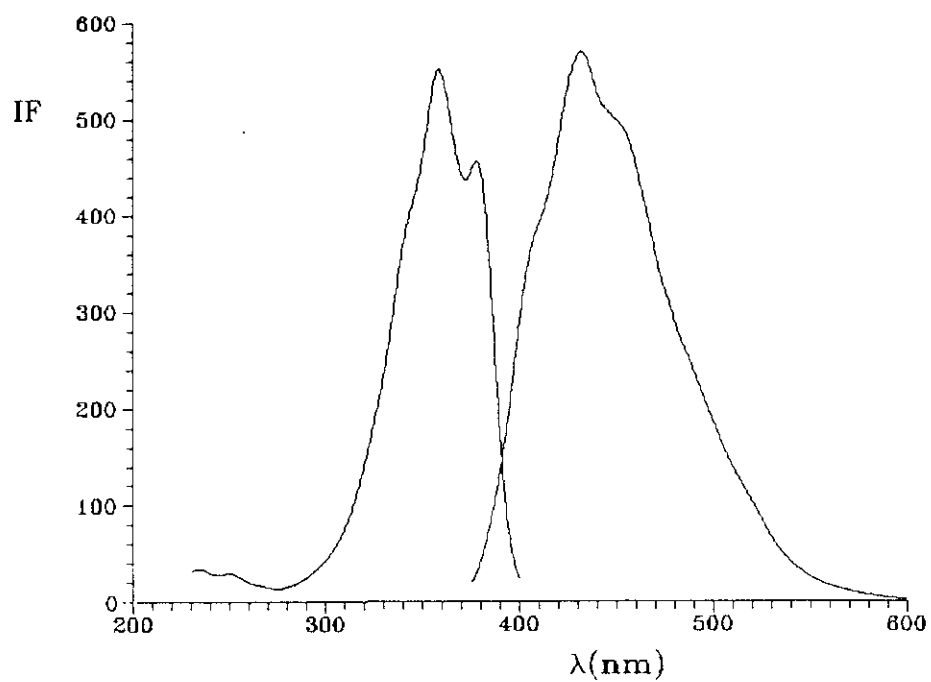


FIGURA 76B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo acetato de retinilo/HP β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

con una elevada intensidad de emisión y un perfil espectral que podría calificarse de característico del complejo, ya que los máximos $\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$, con hombros a $\lambda_{ex} = 385 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$, aparecen a las longitudes de onda que se presentan para este compuesto y la β -CD y tienen características semejantes a las de los complejos de retinal con las distintas ciclodextrinas. Sin embargo, para unas mismas condiciones en la formación del complejo y obteniéndose un espectro de absorción muy similar, el espectro de excitación y emisión fluorescente es diferente. Así, el espectro de excitación muestra dos máximos bien caracterizados a 355 nm y 370 nm y el espectro de emisión corresponde a una banda ancha con un máximo situado a 505 nm (FIGURA 77). Estos espectros son los que se presentan más frecuentemente, mientras que el complejo que emite a 430 nm se observa más esporádicamente.

Esta diferencia en los espectros de fluorescencia podría estar relacionada con la existencia de complejos con distintas características con respecto a la inclusión, ya sea porque los citados complejos presenten distinta estequiometría según el tipo de ciclodextrina, bien porque la geometría de los complejos de inclusión así originados sea distinta, produciendo distintos perfiles espectrales, de forma semejante a los modos de inclusión del salicilato de metilo [1984 PP 185].

III.B.1.1.4.3 ACETATO DE RETINILO/DM β -CD Y TM β -CD

Este complejo de inclusión presenta una buena solubilización en agua según se desprende del espectro de absorción UV-VIS (FIGURA 78A), presentándose la banda de absorción característica del complejo de acetato de retinilo solubilizado, con un máximo de absorción a 330 nm y una pequeña inflexión a 315 nm, junto con un hombro a la longitud de onda habitual de 280 nm. Por el contrario, en el caso de la TM β -CD, el espectro de absorción UV-VIS (FIGURA 79A), indica que el proceso de inclusión es dificultoso, ya que no aparece la banda de absorción característica. Este hecho se confirma por la débil de fluorescencia observada para las soluciones en las que se ensayó la formación del complejo con TM β -CD y acetato de retinilo (FIGURA 79B).

Los espectros de excitación y emisión fluorescente del complejo de acetato de retinilo y DM β -CD, muestran máximos de excitación a $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$ (FIGURA 78B). Es decir, la posición de los máximos, así como el perfil ancho de las bandas

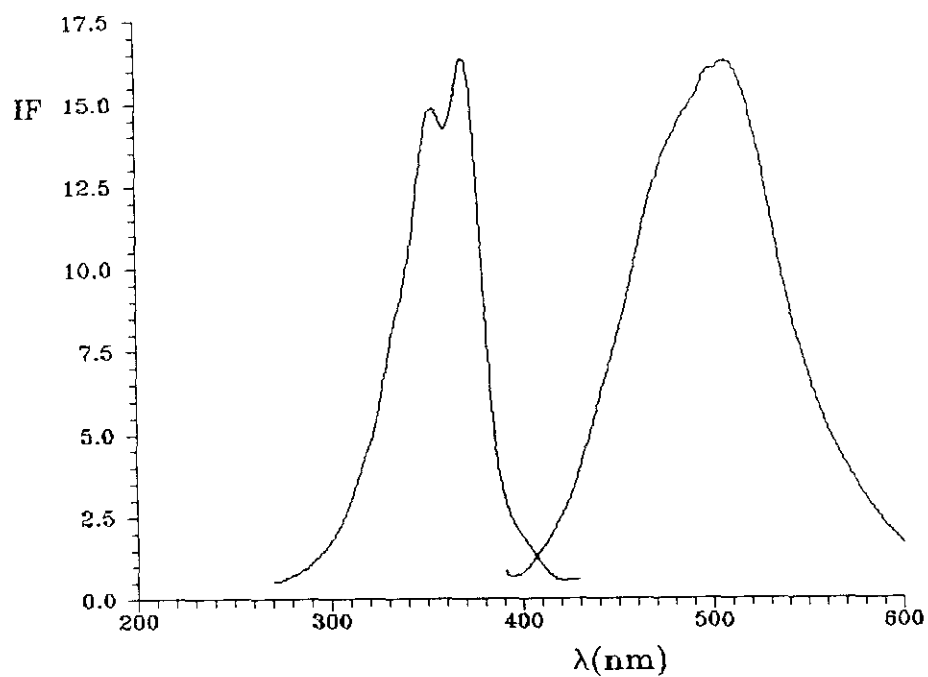


FIGURA 77: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$) del complejo acetato de retinilo/HP β -CD en solución acuosa. IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

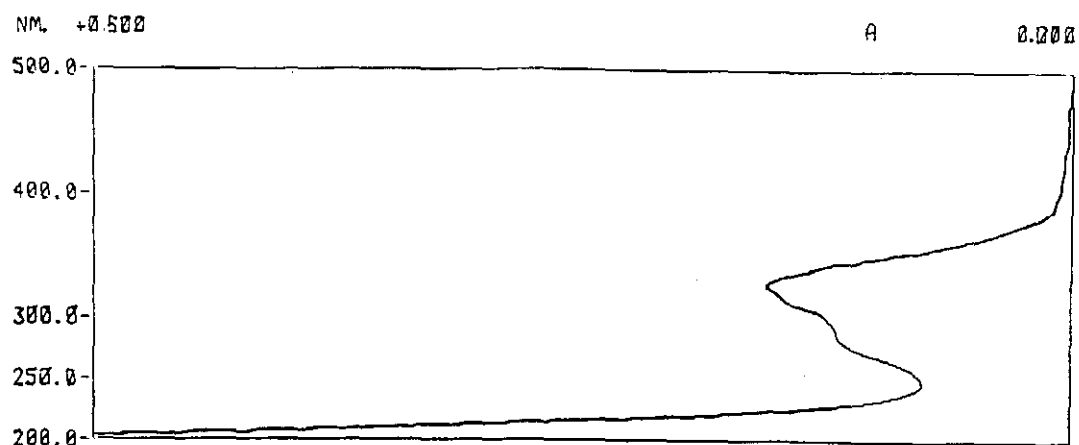


FIGURA 78A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo acetato de retinilo/DMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

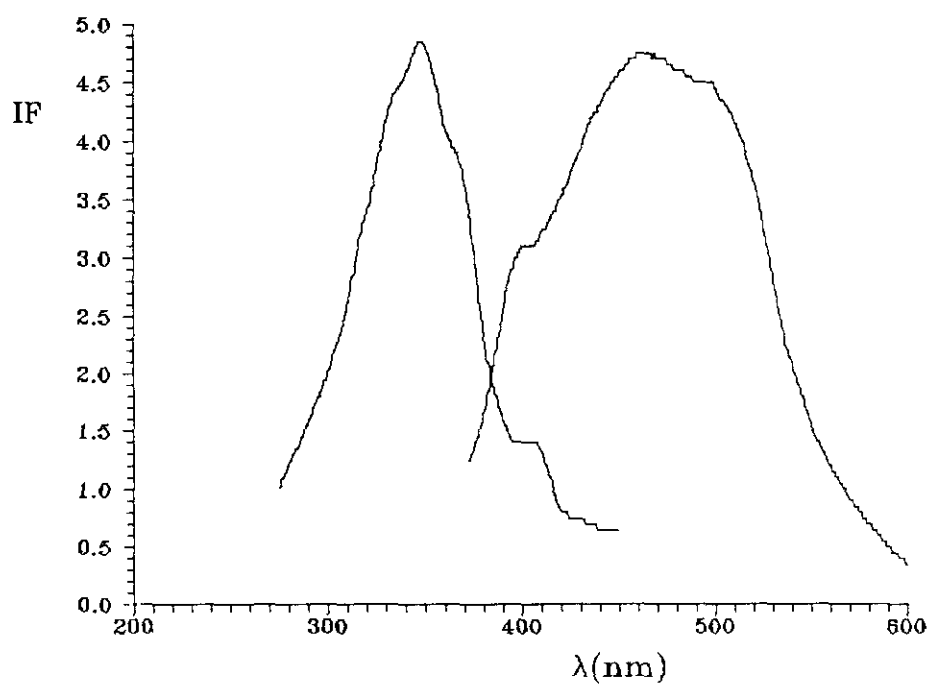


FIGURA 78B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 350$ nm) del complejo acetato de retinilo/DMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

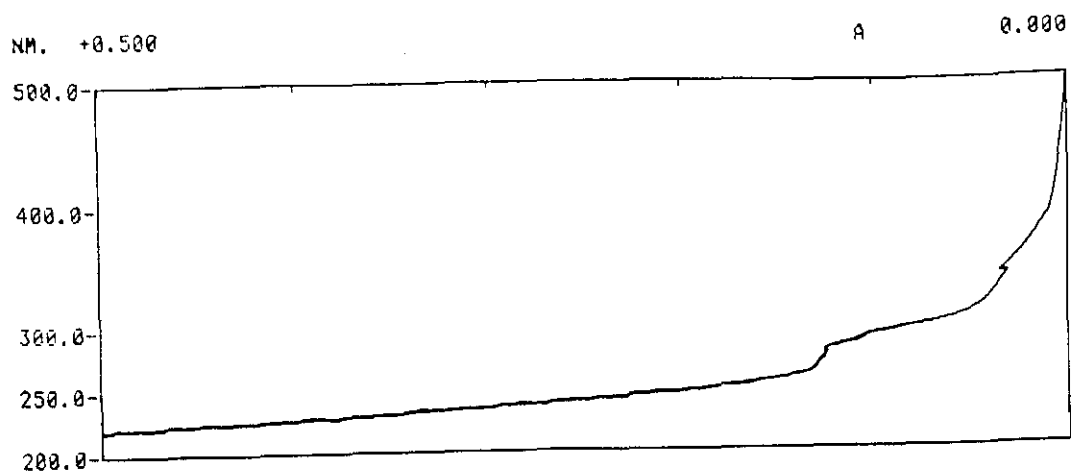


FIGURA 79A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo acetato de retinilo/TMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

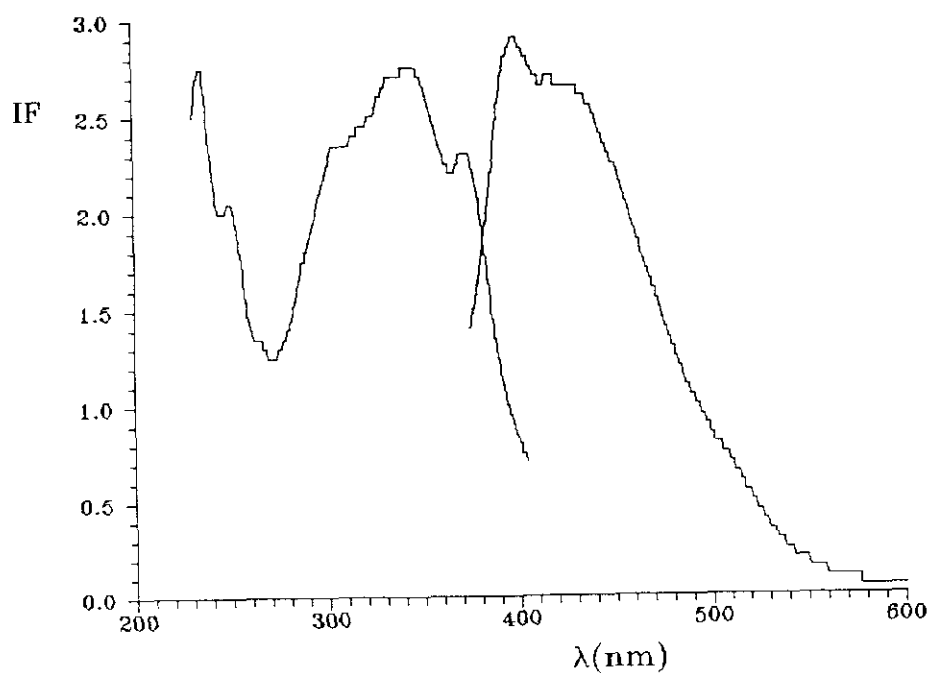


FIGURA 79B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 350$ nm) del complejo acetato de retinilo/TMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

de excitación y de emisión fluorescente de este compuesto es muy parecido a lo que se aprecia cuando el acetato de retinilo está disuelto en etanol.

Las posiciones de estos máximos de excitación y de emisión, para el acetato de retinilo/DM β -CD, son intermedias entre lo que se observa para los complejos de acetato de retinilo/ β -CD y acetato de retinilo/HP β -CD, lo cual puede relacionarse con la naturaleza de la ciclodextrina que incluye. Así pues, la cavidad de la HP β -CD es más larga que la de la DM β -CD y ésta de mayor longitud que la de la β -CD. Si suponemos que el acetato de retinilo queda más protegido por la cavidad de la HP β -CD, algo menos por la DM β -CD y menos aún por la β -CD, lo que explicaría el hecho de que con la β -CD, los máximos de excitación y emisión aparezcan a $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm (FIGURA 80), mientras que cuando la molécula se encuentra en un entorno menos polar como el etanol (FIGURA 81) o el hexano (FIGURA 82), los máximos de excitación y de emisión fluorescente aparecen a $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 475$ nm, longitudes de onda muy parecidas a las que se obtienen para el complejo de inclusión acetato de retinilo/DM β -CD. El desplazamiento batocrómico del máximo de emisión es aún más marcado ($\lambda_{\text{em}} = 505$ nm) cuando el complejo se forma con la HP β -CD donde la posibilidad de penetración de la molécula es aún mayor. Asimismo, en este caso deberíamos tener en cuenta la posibilidad de que la estequiometría 2:1 (CD/R) en el caso de la HP β -CD sea un factor crucial para condicionar este desplazamiento batocrómico del máximo de emisión.

III.B.1.1.4.4 ACETATO DE RETINILO/ α -CD Y γ -CD

Se obtuvieron los complejos de inclusión con α -CD y γ -CD por el procedimiento habitual. En las FIGURAS 83A y 84A, se presentan los espectros de absorción UV-VIS de ambos complejos. Se puede apreciar que en el caso de la α -CD la solubilización es muy escasa, ya que si bien se presenta una banda de absorción en la región donde absorbe el acetato de retinilo, el valor de la absorbancia para dicha banda es muy bajo. Sin embargo, en el caso de la γ -CD se puede apreciar que la molécula está solubilizada debido a la formación del complejo. El máximo de absorción se sitúa como para los complejos con β -CD y sus análogas a $\lambda_{\text{max}} = 330$ nm. Si comparamos el perfil espectral del complejo acetato de retinilo/ γ -CD, con el que se obtiene para el retinal y la γ -CD, se puede ver que en el caso del acetato, el máximo queda menos definido debido a su proximidad con la subida brusca que comienza a 290-280 nm y también probablemente a que el efecto de

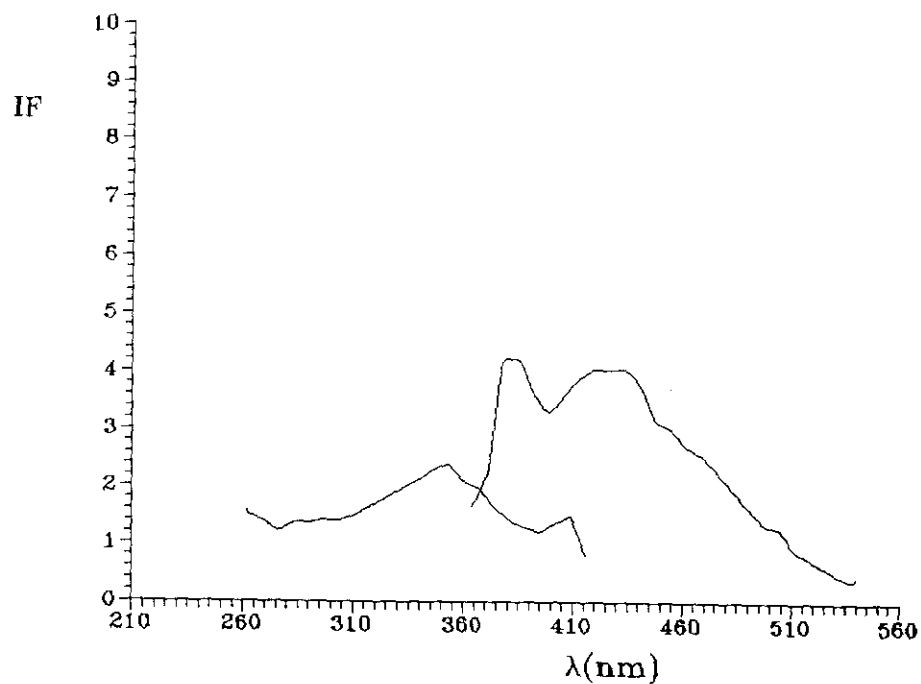


FIGURA 80: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$) del acetato de retinilo en agua, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

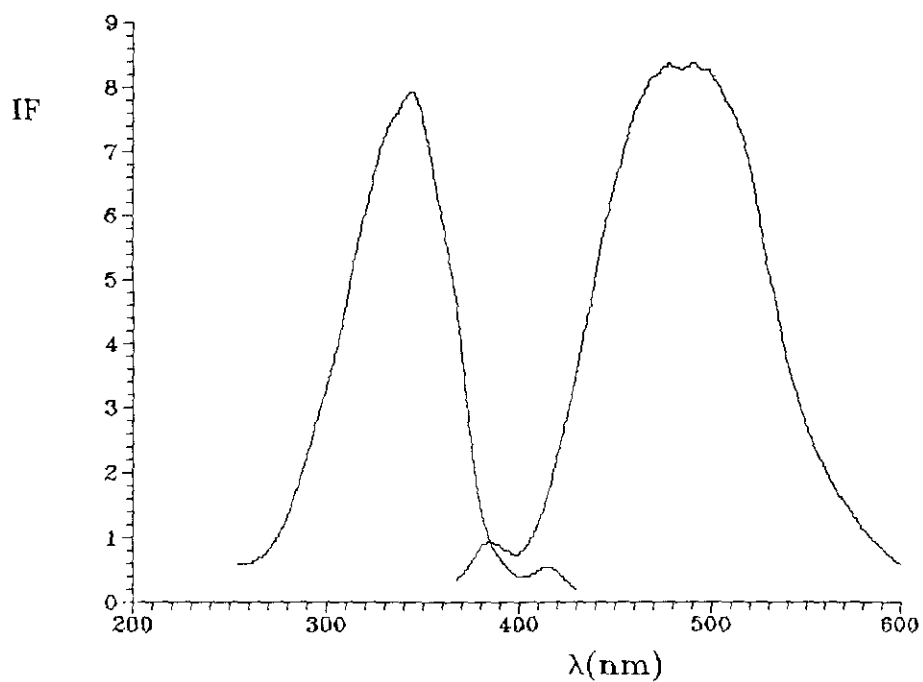


FIGURA 81: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$) del acetato de retinilo en etanol, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

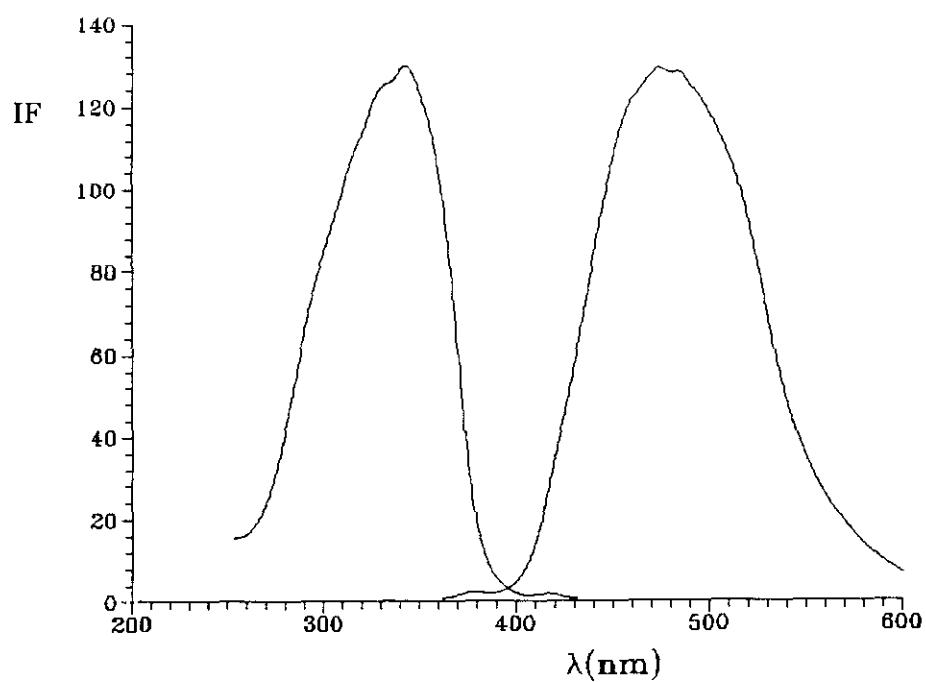


FIGURA 82: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$) del acetato de retinilo en hexano, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

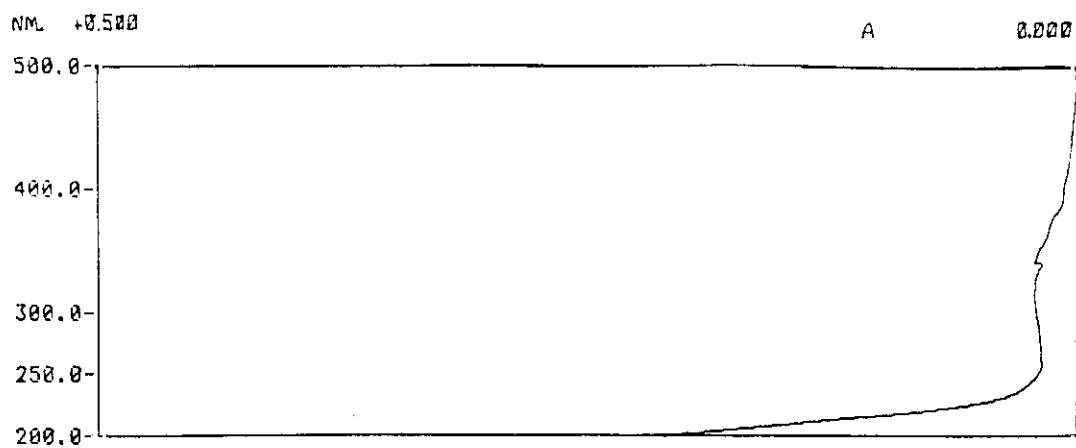


FIGURA 83A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo acetato de retinilo/ α -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

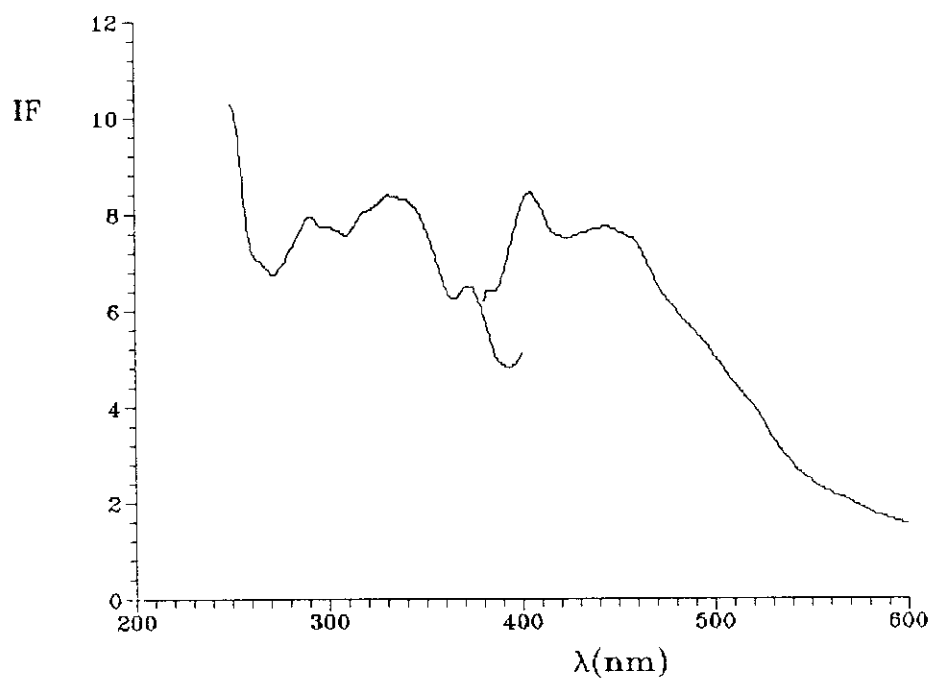


FIGURA 83B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo acetato de retinilo/ α -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

la solubilización de esta ciclodextrina no sea tan eficaz como en el caso de β -, HP β -, DM β - y TM β -CD.

Con respecto a los espectros de fluorescencia obtenidos para los complejos de inclusión con estas ciclodextrinas, existen comportamientos claramente diferenciados. En el caso de la α -CD (FIGURA 83B), se distinguen el espectro de excitación y de emisión fluorescente, no siendo el perfil atribuible al complejo de inclusión. Los máximos se sitúan en torno a $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$. Dado que el acetato de retinilo es fluorescente, pensamos que estas emisiones son debidas a la débil emisión de la molécula solubilizada en agua.

En la FIGURA 84B aparecen los espectros de excitación y emisión fluorescente del complejo de inclusión con γ -CD, siendo la intensidad de emisión notable y el perfil espectral recuerda bastante a lo que se observa cuando el compuesto está disuelto en hexano y etanol. Los máximos de excitación y emisión fluorescente aparecen respectivamente a 355 nm y 480 nm, en posiciones próximas a donde se presentan para la β -CD y los solventes orgánicos. Sin embargo, a diferencia de la β -CD y sus análogas, la banda de emisión en el caso de la γ -CD es muy ancha, como en el caso de los disolventes orgánicos.

Este comportamiento podría explicarse si se considera que la γ -CD forma el complejo de inclusión con el acetato y que por ello se observa fluorescencia en solución acuosa. Sin embargo, puesto que la cavidad de la γ -CD es amplia, la molécula no se encuentra constreñida y por ello el perfil de emisión es ancho. Asimismo, dado que el acetato de retinilo es fluorescente, observamos emisión fluorescente debido a la solubilización de la molécula, pero no se produce una notable mejora en la intensidad de emisión o una mayor resolución espectral, debido a que la molécula no está constreñida y no se impide su libre rotación, como sucede en el caso de la β -CD y sus derivados.

III.B.1.1.5 TODO-*TRANS* RETINOL/CICLODEXTRINAS

III.B.1.1.5.1 RETINOL/ β -CD

En la FIGURA 85A se presenta el espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/ β -CD. Se pueden apreciar dos espectros que corresponden a distintos complejos de

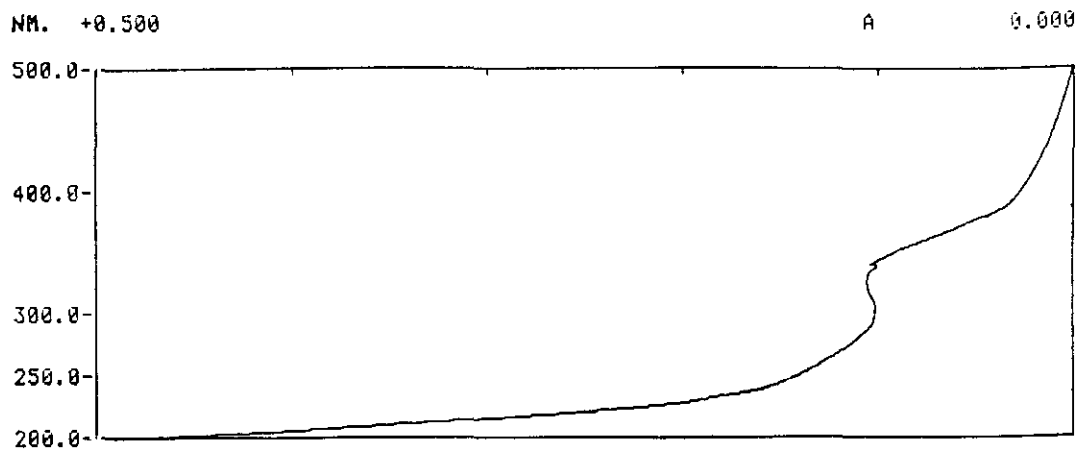


FIGURA 84A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo acetato de retinilo/ γ -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

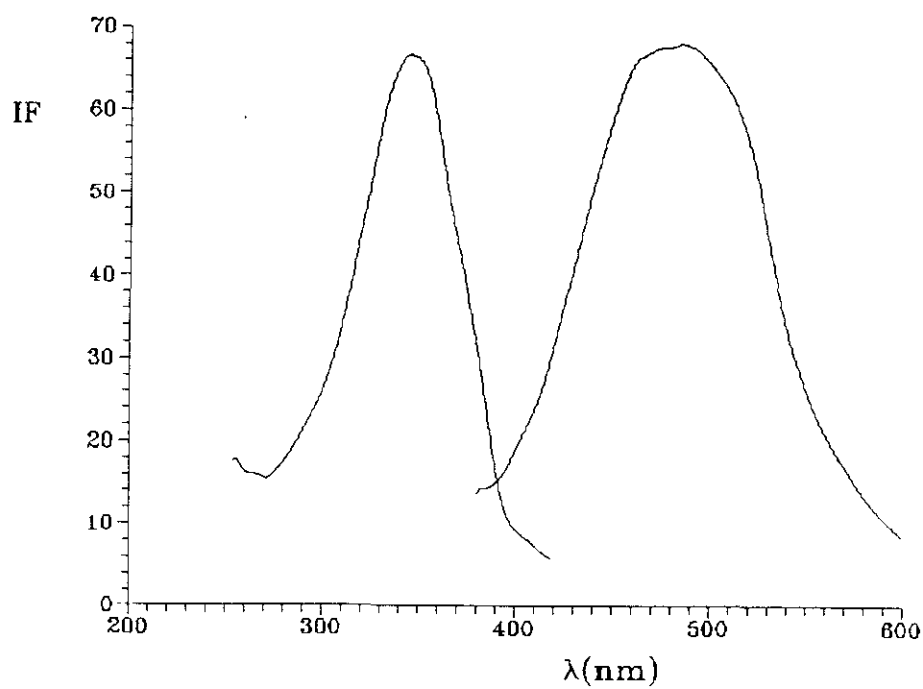


FIGURA 84B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} \approx 470$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo acetato de retinilo/ γ -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

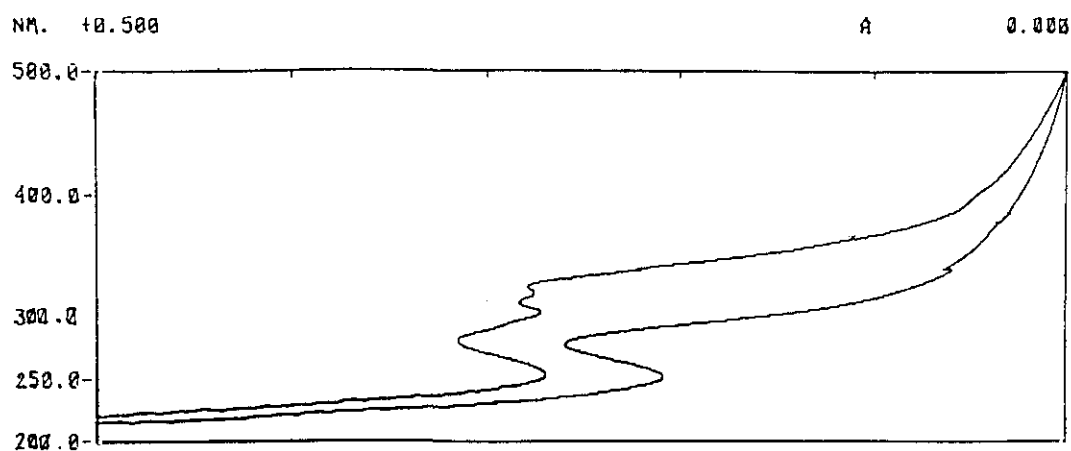


FIGURA 85A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

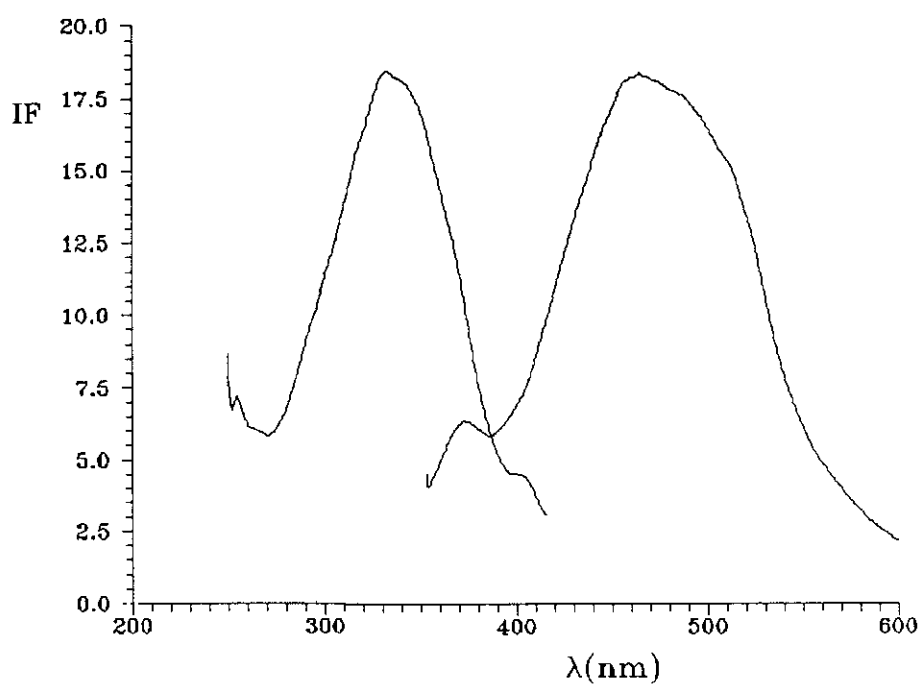


FIGURA 85B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 470$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 330$ nm) del complejo retinol/ β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

retinol obtenidos en idénticas condiciones y a partir de las mismas soluciones madre de retinol y β -CD y sin embargo, los perfiles espectrales difieren notablemente. Mientras en uno se presenta la banda de absorción característica del retinol en solventes orgánicos, como por ejemplo el etanol (FIGURA 86A), con dos pequeños picos situados a 330 nm y 315 nm y acompañados de la banda de absorción de 280 nm, o en hexano (FIGURA 87A), en el otro espectro sin embargo se aprecia únicamente una banda de absorción bien definida con un máximo a 280 nm, probablemente debido a que la formación del complejo no es la adecuada y a que existen microcristales en solución que dan lugar a procesos de dispersión de la luz. Este comportamiento tan dispar con respecto a la formación de complejos de inclusión con retinol es muy frecuente para esta molécula siendo la causa de la gran variabilidad de resultados que se comentará posteriormente.

Los espectros de excitación y emisión fluorescente del complejo de retinol con β -CD muestran los máximos de excitación y emisión característicos $\lambda_{ex} = 335$ nm y $\lambda_{em} = 470$ nm y un hombro que aparece en el espectro de emisión en torno a 505-510 nm (FIGURA 85B). Si comparamos con los espectros de excitación y emisión fluorescente obtenidos en dos solventes orgánicos, etanol (FIGURA 86B) y hexano (FIGURA 87B), se aprecia que el perfil espectral es más fino para el complejo de inclusión que para el retinol en medios homogéneos. Sin embargo, dado que esta molécula es fluorescente, la formación del complejo de inclusión no conlleva un aumento en la intensidad de emisión con respecto a la que se observa en solventes orgánicos, sino que lo que se produce es una disminución. No obstante, esta molécula no presenta fluorescencia en agua debido a su baja solubilidad y por tanto el hecho de que se observe fluorescencia en solución acuosa gracias a la formación del complejo de inclusión es muy significativo, ya que implica que la molécula está solubilizada. Por otra parte, si observamos fluorescencia aunque su intensidad es ligeramente inferior a la que presenta en disolventes orgánicos, se puede afirmar que el entorno que rodea al retinol impide la desactivación del estado excitado y que además su polaridad es semejante o algo más elevada que la del etanol.

III.B.1.1.5.2 RETINOL/HP β -CD

Los espectros de absorción UV-VIS de los complejos de retinol con HP β -CD (FIGURA 88A) muestran un comportamiento semejante al descrito para la de β -CD. Es

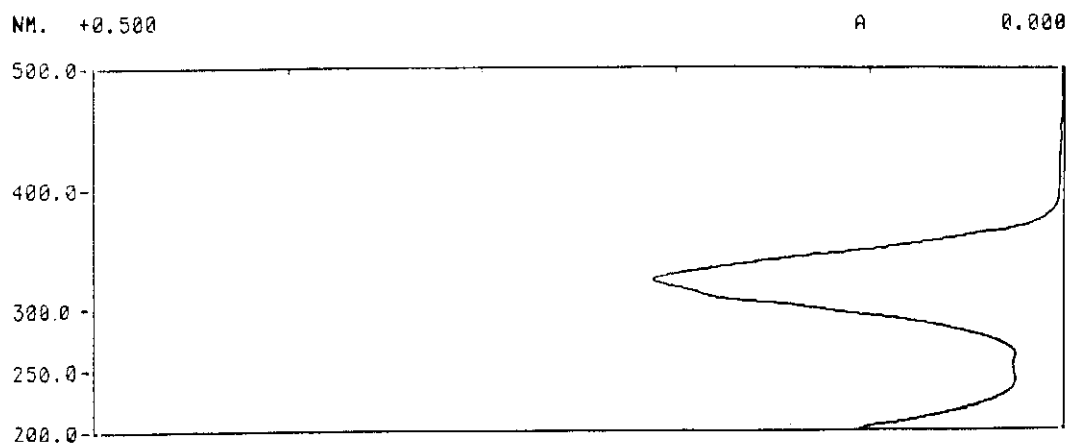


FIGURA 86A: Espectro de absorción UV-VIS del retinol en etanol. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

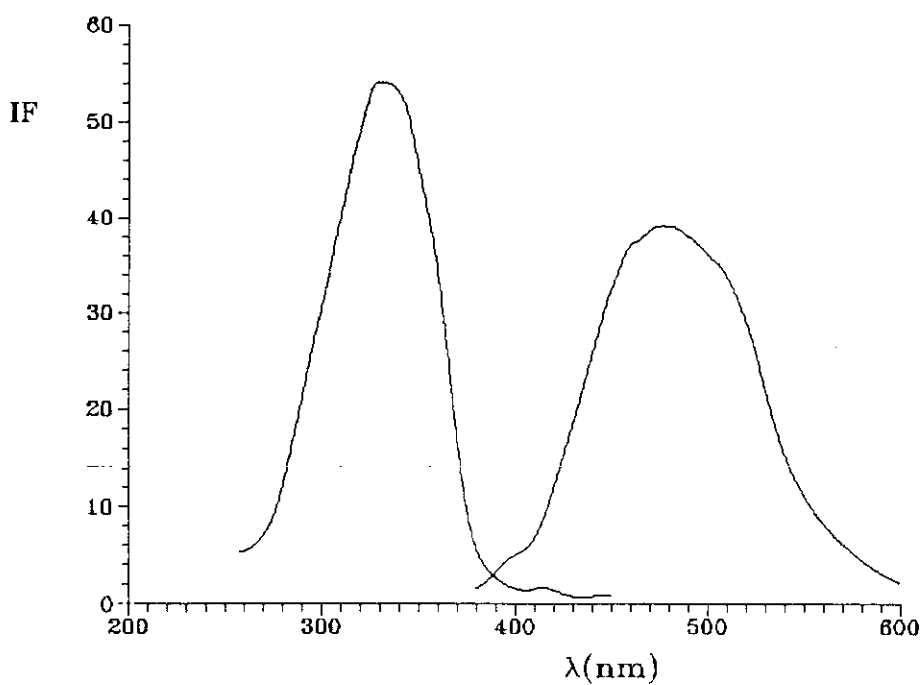


FIGURA 86B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$) del retinol en etanol, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

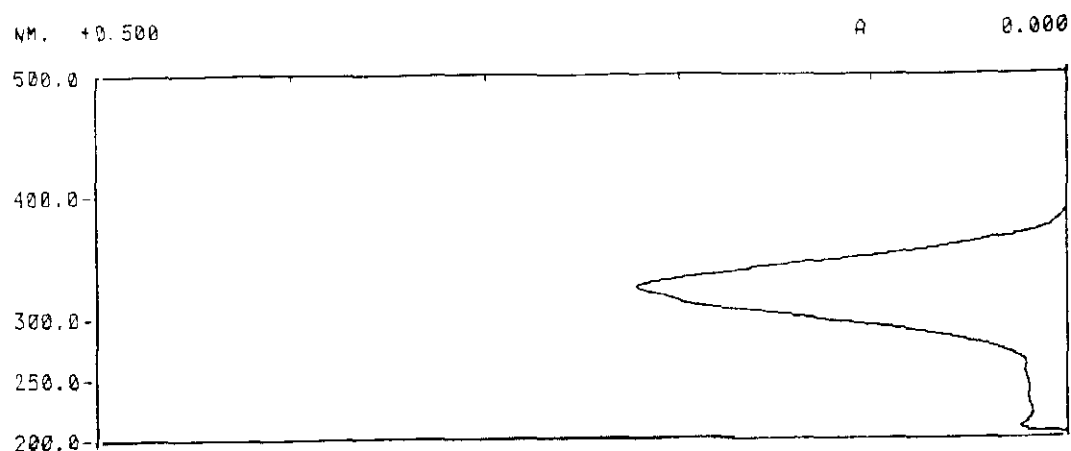


FIGURA 87A: Espectro de absorción UV-VIS del retinol en hexano. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

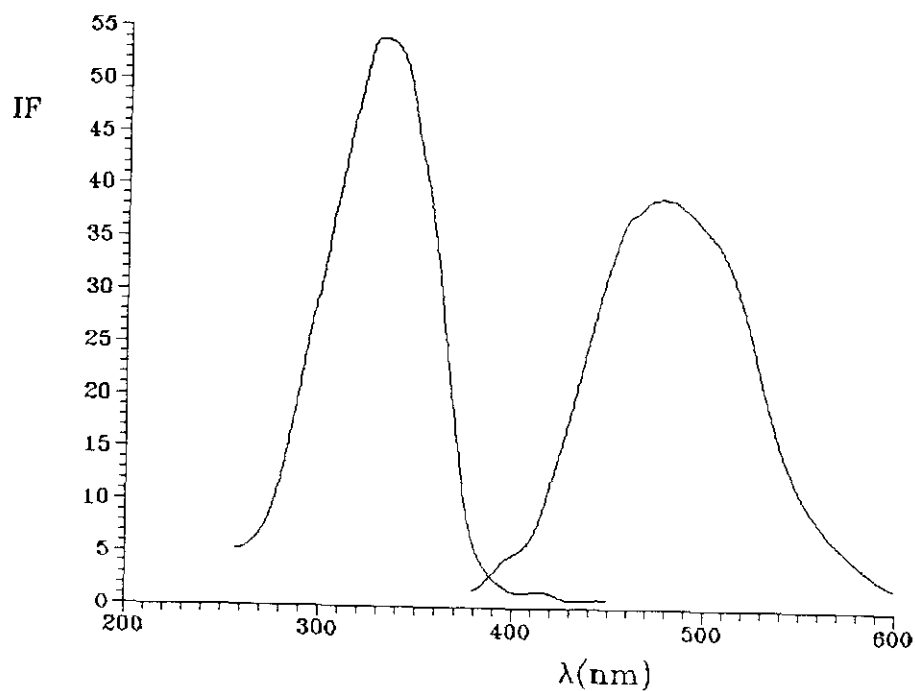


FIGURA 87B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$) del retinol en hexano, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

decir, complejos obtenidos en idénticas condiciones, dan espectros de absorción claramente diferentes.

Cuando se logra una buena solubilización del retinol, el máximo de absorción aparece a 330 nm y no surge la banda de 280 nm, puesto que la solubilidad en agua de la HP β -CD así como de sus complejos, es superior a la de la β -CD. Sin embargo, en la misma figura se puede apreciar que en muchas ocasiones la formación del complejo no se produce, apareciendo únicamente la banda de 280 nm, probablemente debido a que el retinol no está solubilizado.

Los espectros de excitación y emisión fluorescente muestran un perfil análogo al que se obtiene para el acetato de retinilo y esta misma ciclodextrina. Así, las bandas aparecen más agudas y definidas (FIGURA 88B) con un máximo de excitación $\lambda_{ex} = 370$ nm, acompañado de un hombro a 350 nm, mientras que la banda de emisión, que es más ancha que la de excitación, muestra un máximo a 510 nm, acompañado de un hombro a 480 nm. Esta inversión en la posición de hombros y máximos con respecto al complejo con β -CD, se ha descrito anteriormente para el acetato de retinilo y la HP β -CD.

III.B.1.1.5.3 RETINOL/DM β -CD Y TM β -CD

En las FIGURAS 89A y 90 se presentan los espectros de absorción de los complejos de inclusión del retinol con DM β -CD y TM β -CD respectivamente. El complejo de retinol/DM β -CD muestra una buena solubilización en agua, como lo demuestra la aparición de la banda de absorción característica del retinol, con una apreciable absorbancia. Por el contrario, en el caso de la TM β -CD la solubilización es prácticamente nula, ya que no aparece la banda de absorción característica del retinol y sí un hombro pequeño a 280 nm.

En el caso de la DM β -CD el complejo exhibe una débil fluorescencia (FIGURA 89B) con los máximos característicos del complejo de inclusión con retinol a $\lambda_{ex} = 340$ nm y $\lambda_{em} = 465$ nm. En el caso de la TM β -CD no se observa fluorescencia alguna.

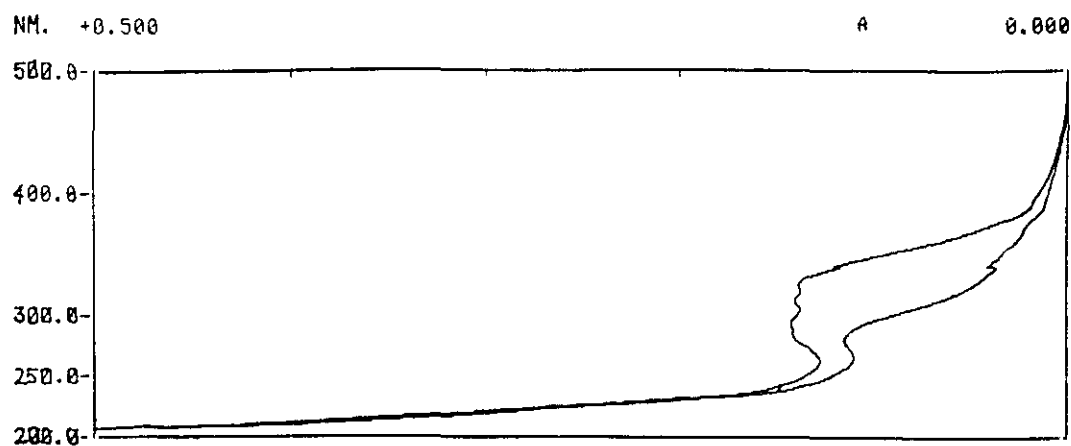


FIGURA 88A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

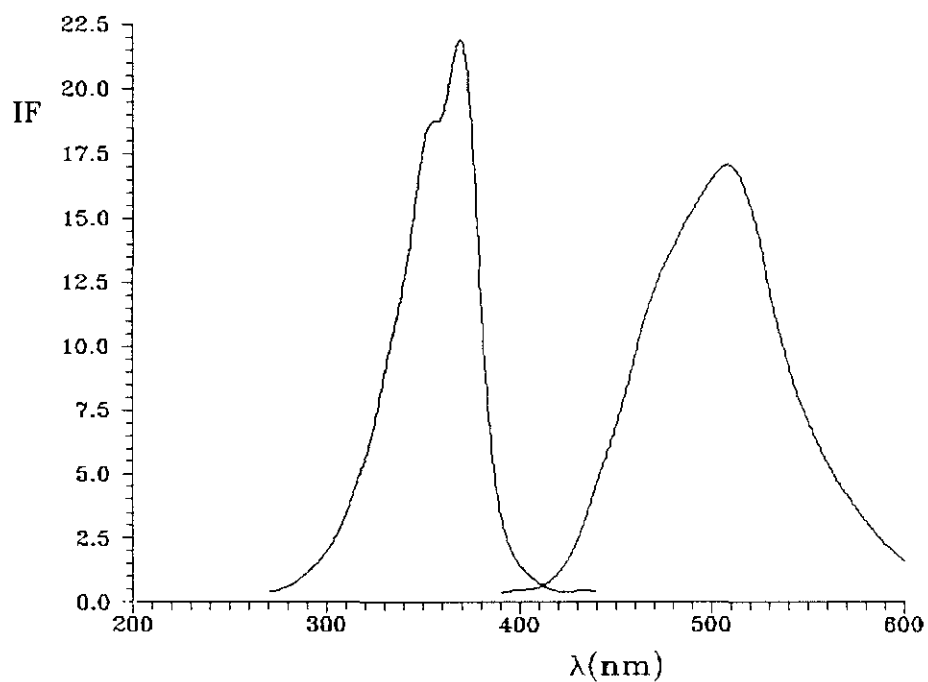


FIGURA 88B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 510$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 370$ nm) del complejo retinol/HP β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

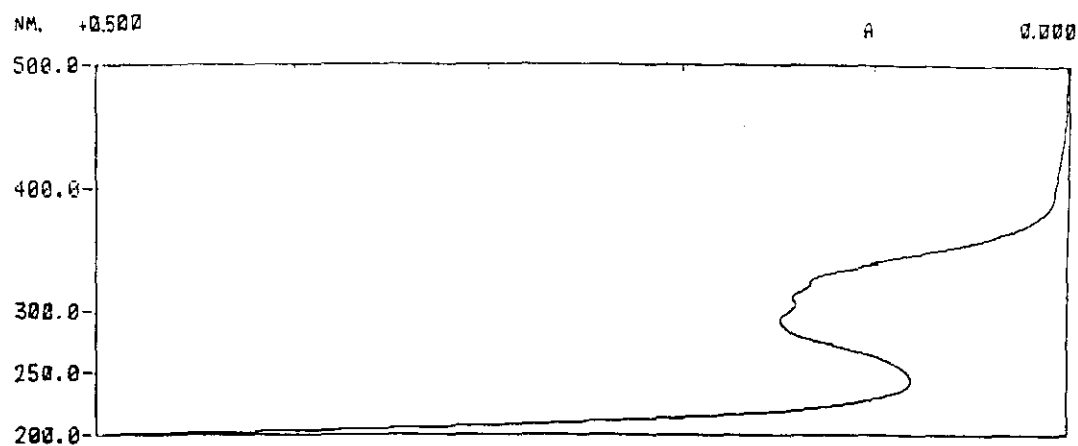


FIGURA 89A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/DMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

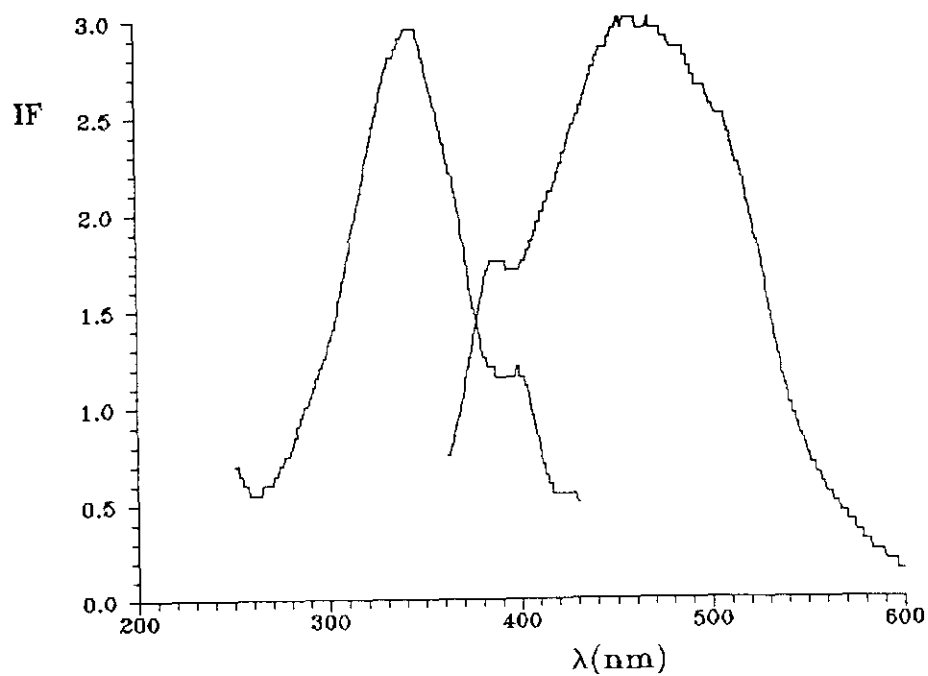


FIGURA 89B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 465$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) del complejo retinol/DMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

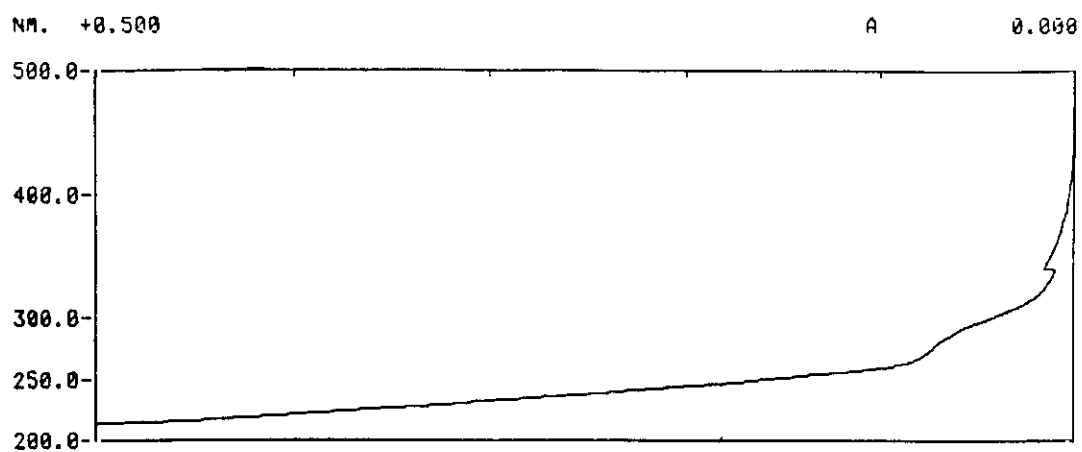


FIGURA 90: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/TMB-CD en solución acuosa.
A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

III.B.1.1.5.4 RETINOL/ α -CD Y γ -CD

Los espectros de absorción UV-VIS de los complejos de inclusión con estas dos ciclodextrinas (FIGURAS 91A y 92) demuestran una muy débil o prácticamente nula solubilización del retinol. Por ello, el proceso de inclusión en ambas ciclodextrinas no está favorecido. En ambas figuras se distingue claramente la banda de absorción a 280 nm, probablemente debido a las moléculas de retinol que se agregan.

De igual manera que se ha descrito para las ciclodextrinas modificadas (DM β -CD y TM β -CD), la fluorescencia obtenida para estos complejos es muy baja dada la pequeña absorbancia que exhiben sus espectros de absorción UV-VIS. En la FIGURA 91B, aparecen los máximos de excitación y de emisión fluorescente $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm, obtenidos para el complejo retinol/ α -CD. Si se comparan con los espectros de fluorescencia obtenidos en el caso de la β -CD y la HP β -CD, la intensidad de fluorescencia en el caso de la α -CD es aproximadamente 10 veces menor y además se presenta un desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión del complejo. Este hecho podría relacionarse con el distinto modo de inclusión de la molécula de retinol, en el caso de la α -CD, de acuerdo con lo supuesto para otros retinoides ya descritos.

En el caso de la γ -CD no se pudo observar fluorescencia, tras múltiples y repetidos ensayos. Este hecho, algo inusual, puede guardar relación con la dificultad del proceso de inclusión del retinol en las distintas ciclodextrinas y los resultados tan aleatorios que se obtienen para idénticas condiciones de formación del complejo.

III.B.1.1.6 ACIDO RETINOICO/CICLODEXTRINAS

El ácido retinoico es la molécula más polar de todos los retinoides estudiados y podría pensarse, después de lo observado para el retinol, que su inclusión en la cavidad apolar de las ciclodextrinas fuera aún más difícil. Contrariamente a esto, el ácido retinoico forma complejos de inclusión estables con las distintas ciclodextrinas y a diferencia de los otros retinoides, la solubilización suele ser más efectiva en el caso de la β -CD que en el caso de la HP β -CD.

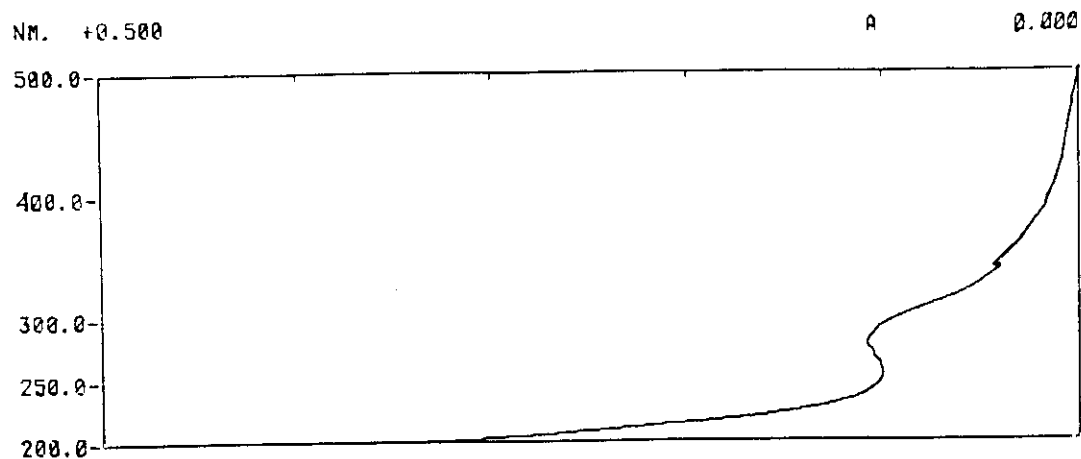


FIGURA 91A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/ α -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

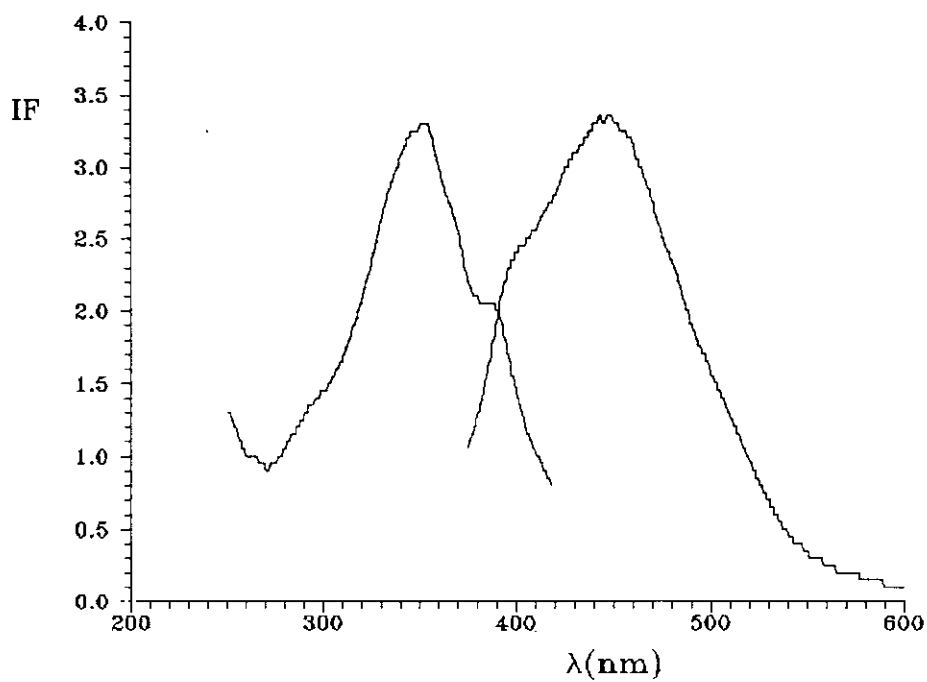


FIGURA 91B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 450$ nm) y emisión ($\lambda_{ex} = 350$ nm) del complejo retinol/ α -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

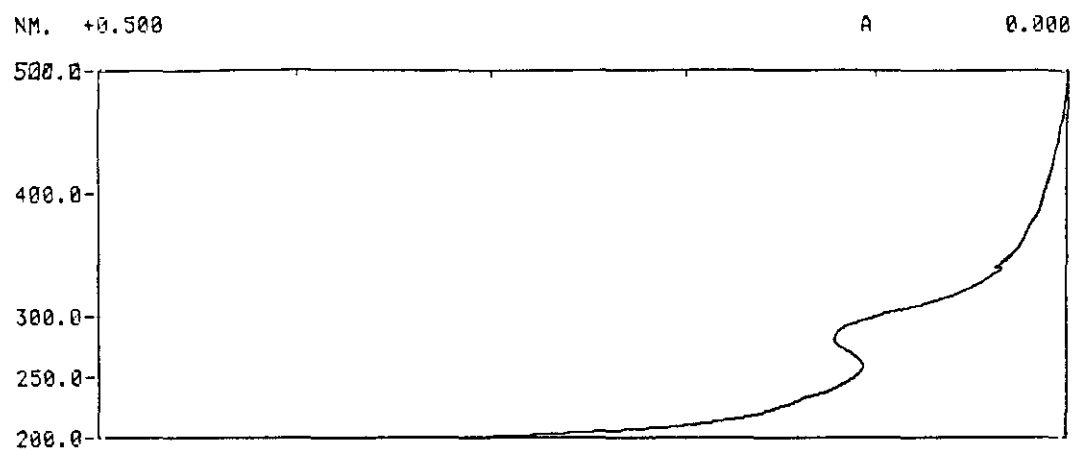


FIGURA 92: Espectro de absorción UV-VIS del complejo retinol/ γ -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

III.B.1.1.6.1 ACIDO RETINOICO/ β -CD

Los complejos de inclusión de ácido retinoico y β -CD muestran una muy buena solubilización de la molécula apolar en agua, lo que implica que la formación del complejo de inclusión está favorecida. Ello se deduce si se observan los espectros de absorción UV-VIS de los complejos ácido retinoico/ β -CD (FIGURA 93A), donde se aprecia una banda de absorción aguda y perfectamente definida, con un máximo a $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$, tanto para la solución más concentrada como para la de menor concentración.

Si se compara con el espectro de absorción de este mismo compuesto en solución etanólica (FIGURA 94), el perfil es muy semejante, con la única diferencia de que el máximo de absorción aparece a 345 nm. En consecuencia la formación del complejo de inclusión con β -CD conlleva un ligero desplazamiento batocrómico del máximo de absorción.

A pesar de que la formación del complejo está favorecida, en numerosas experiencias se obtienen complejos cuyo perfil de absorción UV-VIS corresponde con la FIGURA 95. En ella se puede apreciar el pico de absorción característico del ácido retinoico, con un máximo a 350 nm, junto con la banda, cuyo máximo se sitúa a 280 nm. La aparición de este pico de 280 nm puede relacionarse, como ya se ha comentado anteriormente, con la presencia de pequeños agregados microcristalinos sin solubilizar, ya sea de ciclodextrina, de complejo o de ácido en suspensión.

El complejo muestra fluorescencia apreciable, con máximos a $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$, acompañado de un hombro de emisión a 510 nm (FIGURA 93B). La intensidad de fluorescencia es elevada, por lo que la formación del complejo de inclusión con β -CD permite observar fluorescencia para esta molécula, que al igual el retinal no presenta luminiscencia, salvo a bajas temperaturas y en disolventes orgánicos (alcanos secos). Este hecho se relaciona, bien con la presencia del agrupamiento carbonílico, presente tanto en el ácido como en el retinal pero no en el alcohol, o bien con la desactivación del estado excitado por vía fotoquímica. En consecuencia, la formación del complejo de inclusión, además de permitir observar fluorescencia y por tanto la determinación espectrofluorimétrica de este compuesto en solución acuosa, nos indica que

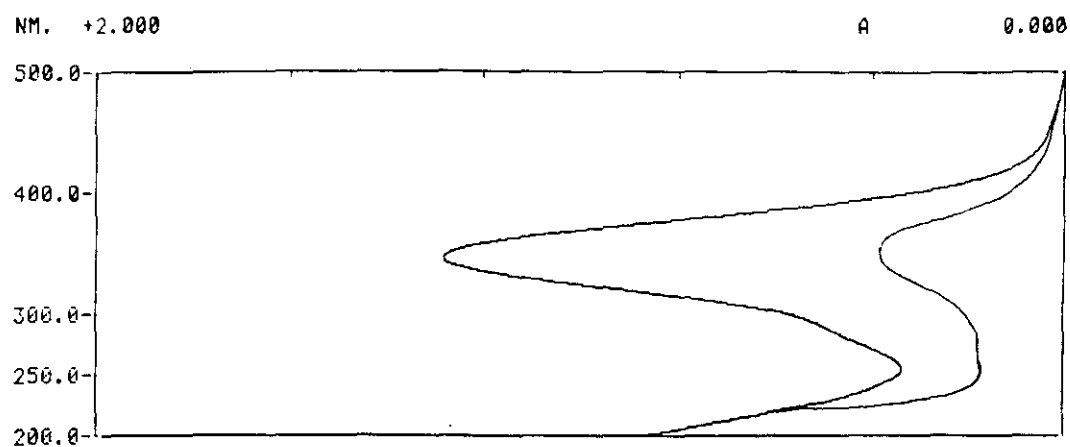


FIGURA 93A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

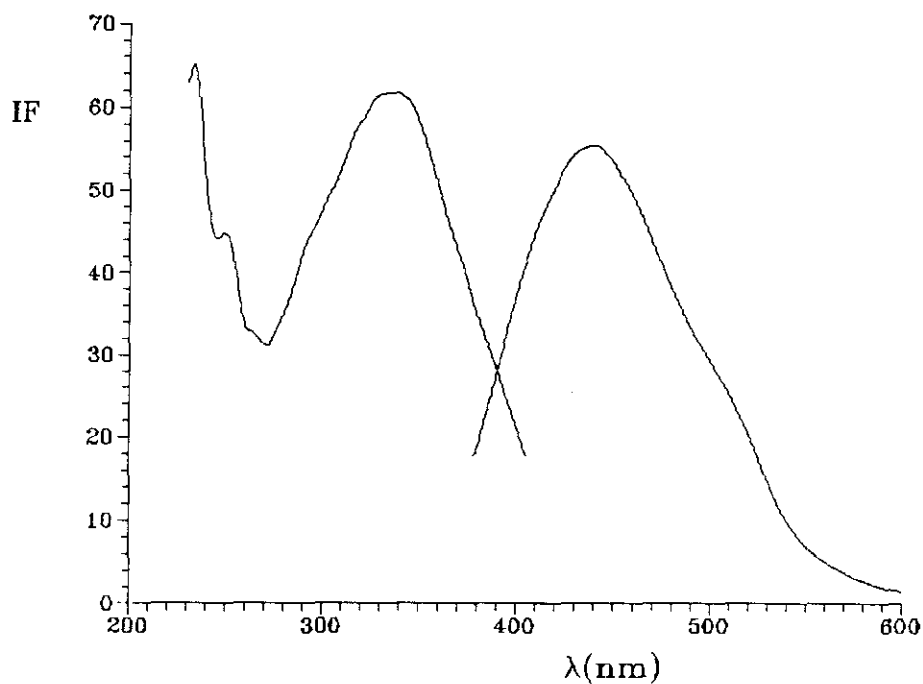


FIGURA 93B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 445$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) del complejo ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

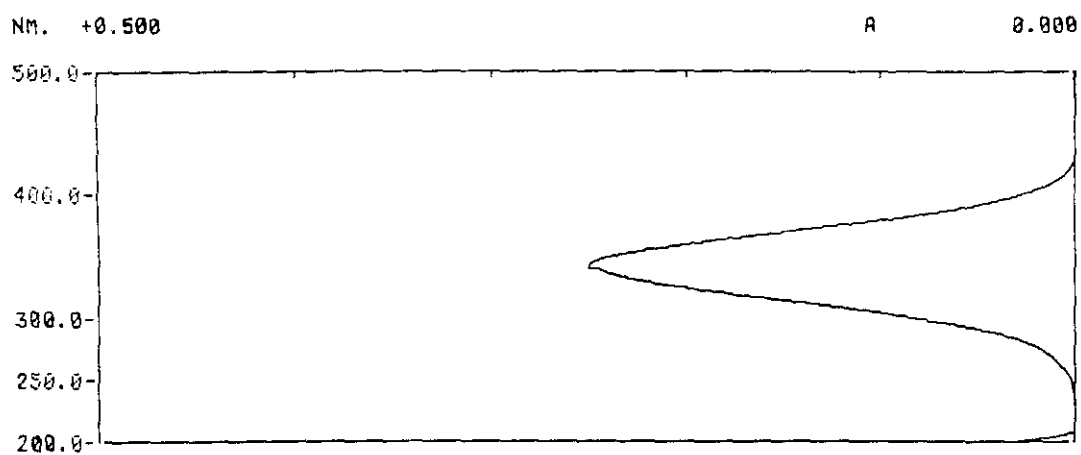


FIGURA 94: Espectro de absorción UV-VIS ácido retinoico en etanol. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

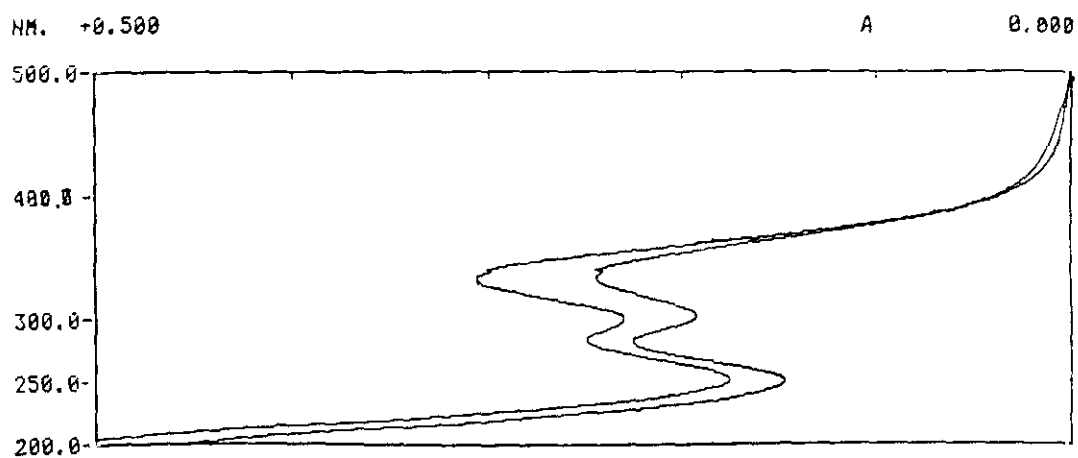


FIGURA 95: Espectro de absorción UV-VIS del complejo ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

el entorno rígido de la ciclodextrina impide la desactivación del estado excitado por vía no radiante o a través de una reacción fotoquímica.

III.B.1.1.6.2 ACIDO RETINOICO/HP β -CD

En la FIGURA 96A se presentan los espectros de absorción UV-VIS de los complejos ácido retinoico/HP β -CD, a dos concentraciones diferentes. En ambos casos se puede apreciar que la solubilización del ácido es buena, ya que el perfil del espectro de absorción está bien definido, mostrando una banda con un máximo situado a 365 nm para la solución más concentrada. El desplazamiento batocrómico del máximo de este complejo, con respecto a la solución etanólica es ligeramente superior al que se observa para el complejo de ácido retinoico y β -CD. En los distintos ensayos de formación de complejo con HP β -CD no se observa la banda de 280 nm, al igual que ocurre para otros retinoides en el caso de esta ciclodextrina. Estos hechos pueden explicarse por la mayor hidrosolubilidad de esta ciclodextrina así como de sus complejos de inclusión.

En la FIGURA 96B se presentan los espectros de excitación y de emisión fluorescentes del complejo ácido retinoico/HP β -CD. Las características fluorescentes del mismo son análogas a las ya descritas para otros retinoides.

III.B.1.1.6.3 ACIDO RETINOICO/DM β -CD Y TM β -CD

Análogamente a lo que se ha descrito para otros retinoides, a excepción del 9-*cis* retinal, la DM β -CD proporciona una solubilización del ácido significativamente mayor que la TM β -CD. En la FIGURA 97A se presenta el espectro de absorción UV-VIS del complejo de inclusión ácido retinoico/DM β -CD. Aparece la banda de absorción característica del ácido en solventes orgánicos, con un máximo a 345 nm. A concentraciones más altas de ácido retinoico, los picos son muy agudos y bien definidos ($\lambda_{\text{max}} = 360$ nm), junto con un ligero desplazamiento batocrómico del máximo de absorción. Por el contrario, el espectro de absorción del complejo ácido retinoico/TM β -CD (FIGURA 98A) indica que la solubilización del ácido retinoico es muy escasa, de forma análoga a lo descrito para otros retinoides con esta misma ciclodextrina.

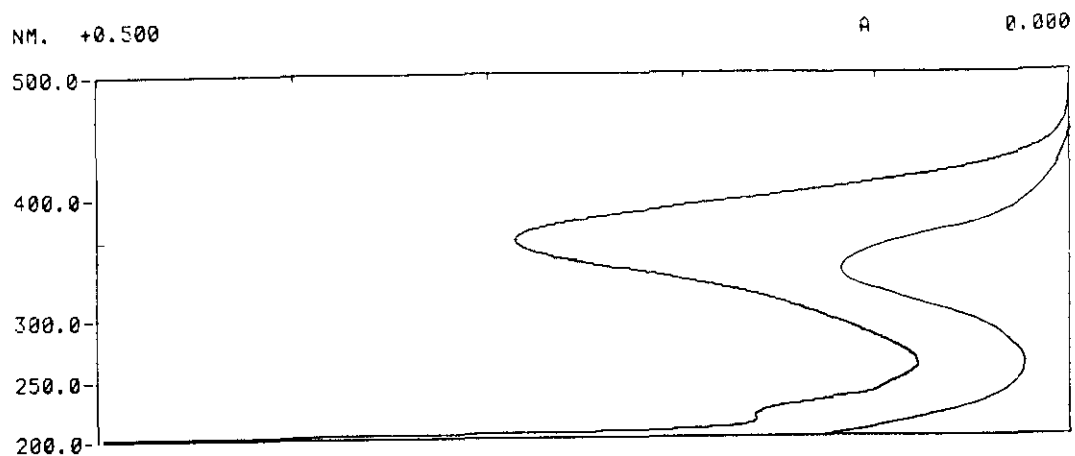


FIGURA 96A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo ácido retinoico/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

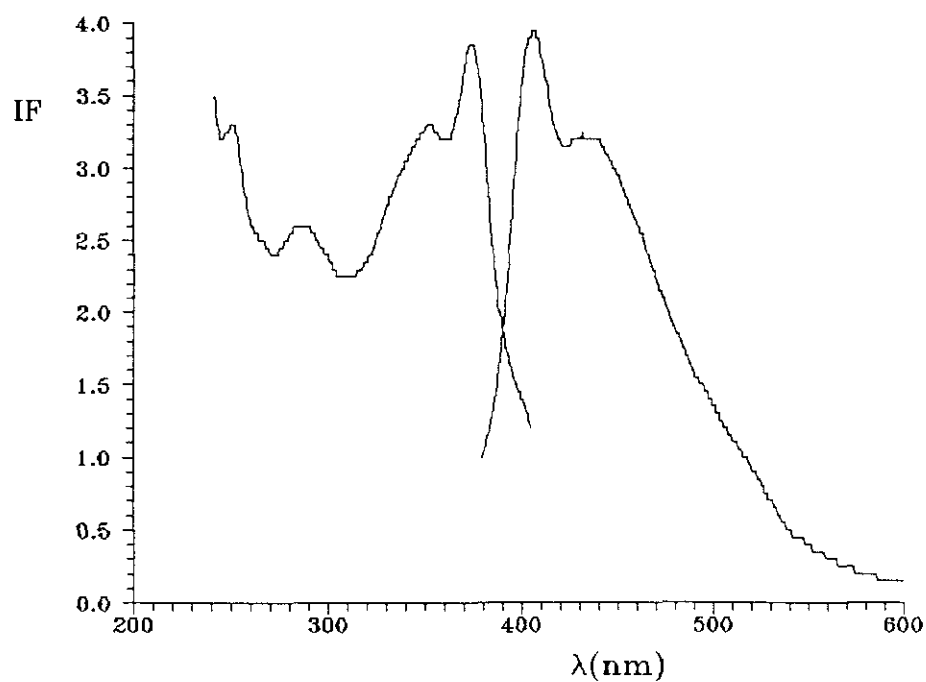


FIGURA 96B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo ácido retinoico/HP β -CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

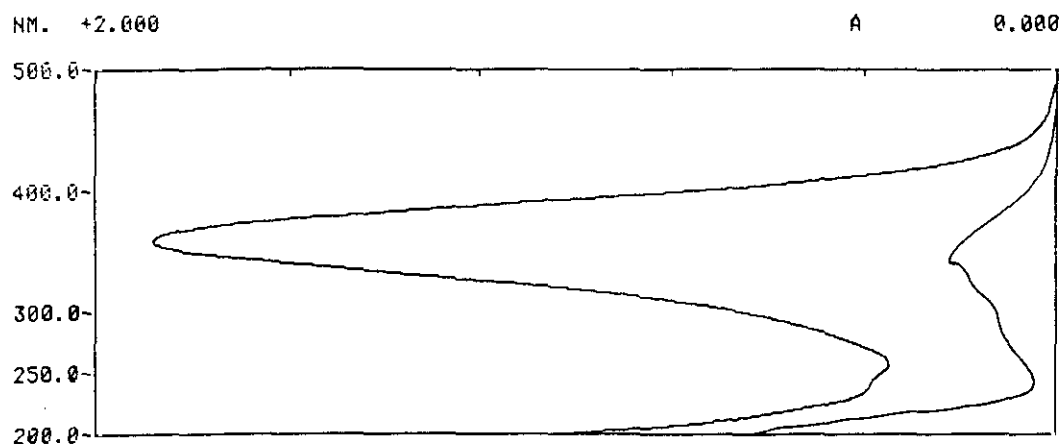


FIGURA 97A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo ácido retinoico/DMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

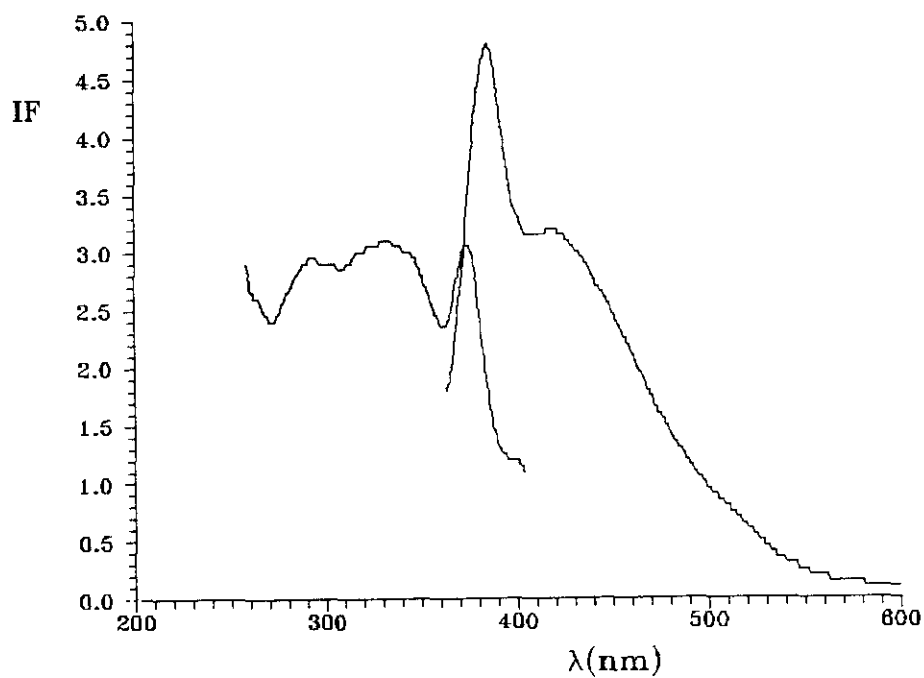


FIGURA 97B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo ácido retinoico/DMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

El complejo ácido DMB-CD muestra una fluorescencia bastante débil, como se desprende de los resultados expuestos en la FIGURA 97B. Las bandas de excitación y de emisión fluorescente del complejo presentan una intensidad máxima a $\lambda_{ex} = 355$ nm y $\lambda_{em} = 430$ nm. En el caso del complejo con la TMB-CD, la intensidad de fluorescencia (FIGURA 98B) es baja, como cabría esperar a la vista del espectro de absorción UV-VIS.

Formación de complejos de inclusion entre ciclodextrinas y ácido retinoico dependiendo de la ionización del mismo

Existen moléculas ionizables para los cuales los procesos de inclusión se ven afectados dependiendo del grado de ionización. Cabría esperar que las formas ionizadas al ser más polares, mostrasen constantes de asociación más bajas que las formas no ionizadas. No obstante esto no es siempre así, puesto que el ion *p*-nitrofenolato tiene una constante de asociación mayor que su correspondiente *p*-nitrofenol [1978 L XLVIII]. Un comportamiento análogo se ha descrito para los ácidos derivados de adamantano carboxílico. El ácido retinoico podría mostrar distinto comportamiento con respecto a la inclusión, según se encuentre ionizado o no. Es por ello que se formó el complejo en medio ácido y en medio básico.

En la FIGURAS 99 y 100 se muestran los espectros de absorción UV-VIS de los complejos formados en medios débilmente ácido y alcalino, junto con el complejo obtenido por el procedimiento habitual en agua. La absorbancia es más alta para la solución básica que para el complejo en agua y ésta mayor que la obtenida para la solución ácida. Estos valores de absorbancia podrían explicarse si se considera que se favorece la inclusión para la forma ionizada con respecto a la forma no ionizada, probablemente porque la forma ionizada es más soluble en agua que la forma no ionizada.

Puesto que para que la molécula se incluya, primero ha de solubilizarse, parece lógico pensar que al favorecerse la solubilización, también se favorezca la inclusión, a pesar de que la forma incluida sea más polar. Asimismo, hemos de considerar que el ácido retinoico es una molécula con un cierto carácter anfifílico, por lo que su ionización podría favorecer la orientación en la cavidad de la ciclodextrina y por tanto la inclusión. No obstante, a la vista de los resultados experimentales, las diferencias en los espectros no

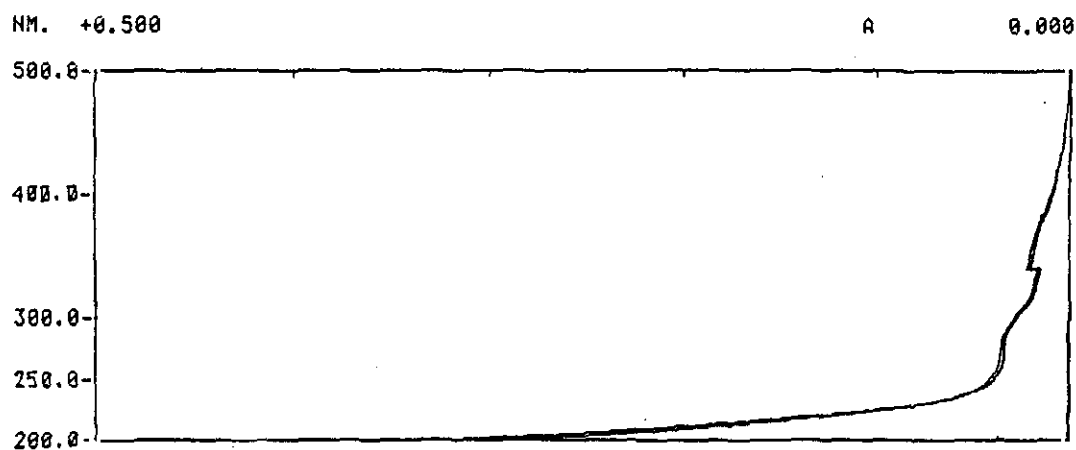


FIGURA 98A: Espectro de absorción UV-VIS del complejo ácido retinoico/TMB-CD en solución acuosa. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

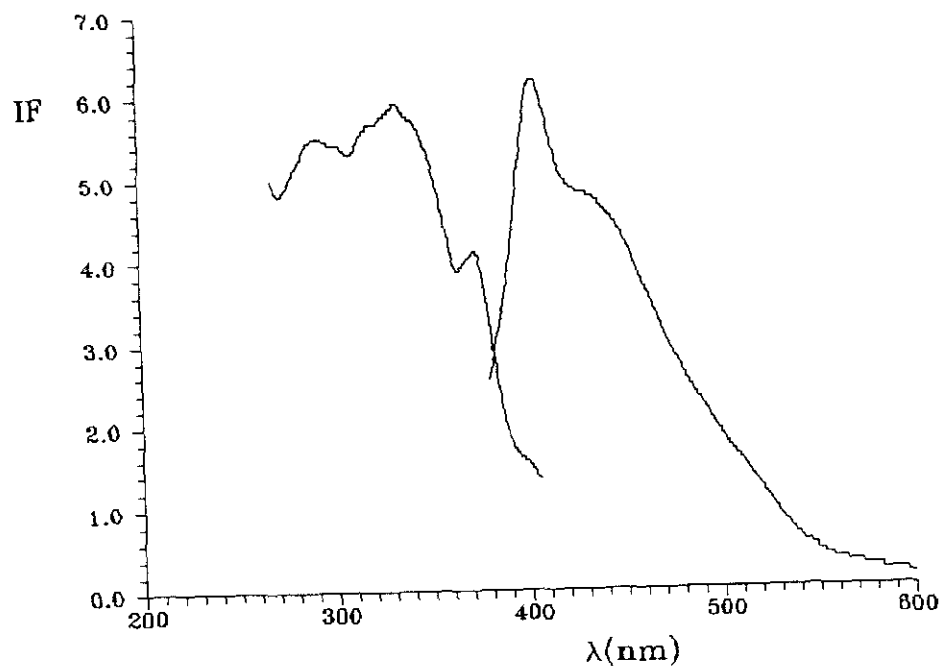


FIGURA 98B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} \approx 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355$ nm) del complejo ácido retinoico/TMB-CD en solución acuosa, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

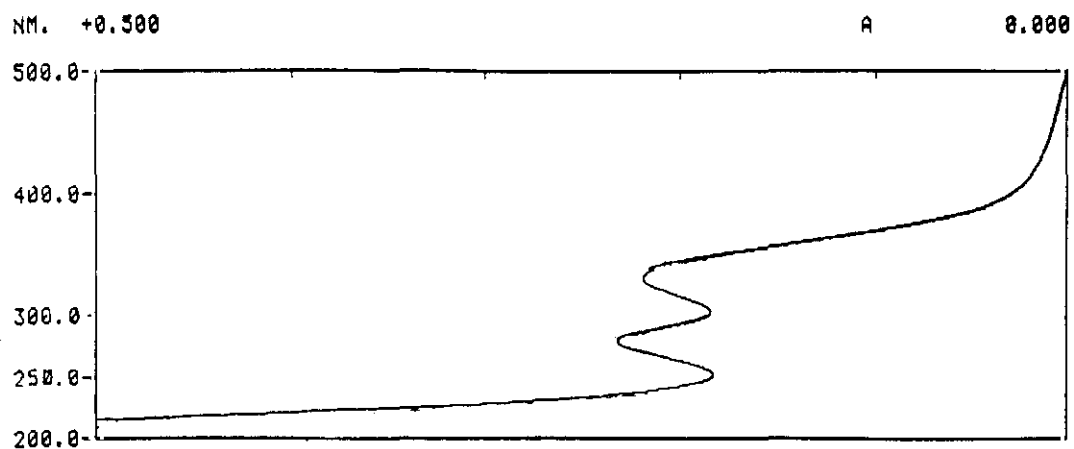


FIGURA 99: Espectro de absorción UV-VIS del ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa preparado de la forma habitual, A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

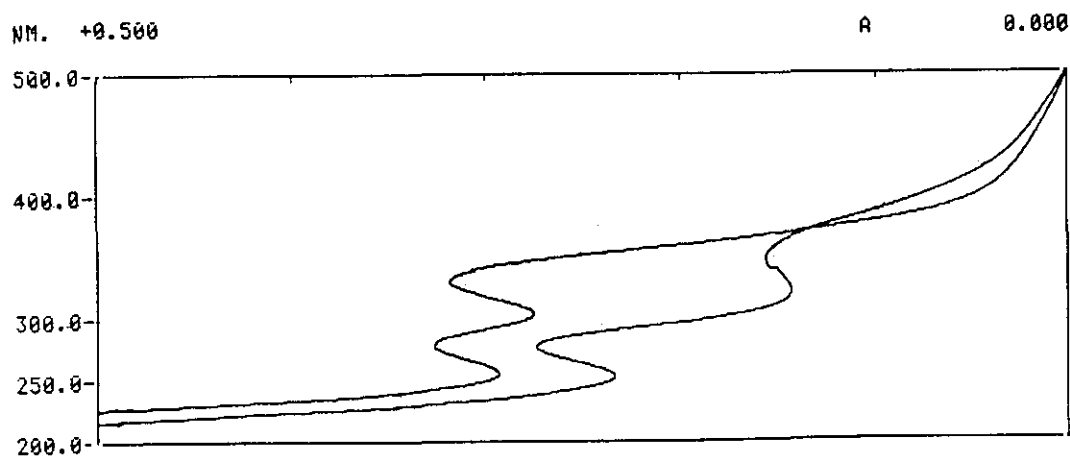


FIGURA 100: Espectro de absorción UV-VIS del ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa. (1) Complejo formado en medio débilmente ácido y (2) débilmente alcalino, A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

pueden considerarse lo suficientemente significativas con respecto al proceso de inclusión según características ácido-base del medio de reacción.

III.B.1.1.7 TODO-*TRANS* RETINAL/MICELAS

En las FIGURAS 101A-104A se presentan los espectros de absorción UV-VIS del retinal en medios microscópicamente organizados. Se utilizaron en estas experiencias 4 tensoactivos diferentes: SDS (aniónico), CTAB (catiónico), Brij-35 y Triton X-100 (no iónicos). En todos los casos el proceso de solubilización es mucho más rápido que en el caso de la ciclodextrinas, requiriéndose menor tiempo de agitación, ello se debe a que en este caso no se produce un verdadero proceso de inclusión. Además, las micelas son un sistema dinámico y de igual forma que se produce más fácilmente la solubilización, la salida de las moléculas retenidas en la fase apolar de la micela es también mucho más sencilla.

Podemos afirmar que en todos los tensoactivos estudiados se produce una solubilización eficaz del retinal (que se encuentra en la misma concentración que la que se utiliza para la formación de complejos con ciclodextrinas). Estos hechos se pueden apreciar porque la banda de absorción del retinal ($\lambda_{\text{max}} = 380\text{-}385\text{ nm}$) aparece claramente definida y estrecha, como en el caso de los solventes orgánicos. El máximo de absorción se presenta como en el caso de las ciclodextrinas, aproximadamente a 380 nm. Por otra parte, en las experiencias realizadas con retinal y tensoactivos, no se aprecia en los espectros de absorción UV-VIS la banda cuyo máximo se sitúa a 280 nm.

Todos los tensoactivos cuando solubilizan al retinal, permiten que se observe la fluorescencia del mismo. En las FIGURAS 101B-104B se muestran los espectros de excitación y emisión fluorescente del retinal en los distintos medios micelares considerados. Como se puede apreciar, la fluorescencia desarrollada es intensa, pudiendo atribuirse a dos hechos: por una parte a que las micelas proporcionan un entorno capaz de proteger al estado excitado del retinal, facilitando su desactivación por vía radiante; por otra parte, si se tiene en cuenta que la solubilización de este compuesto es mayor en los distintos tensoactivos que en las ciclodextrinas al ser mayor la fracción de moléculas solubilizadas, así pues la probabilidad de emisión es también mayor.

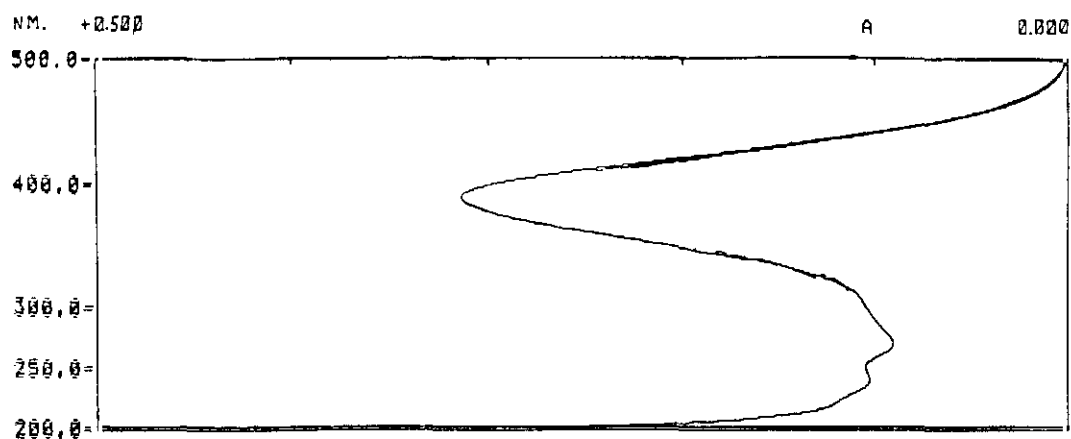


FIGURA 101A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinal/SDS. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

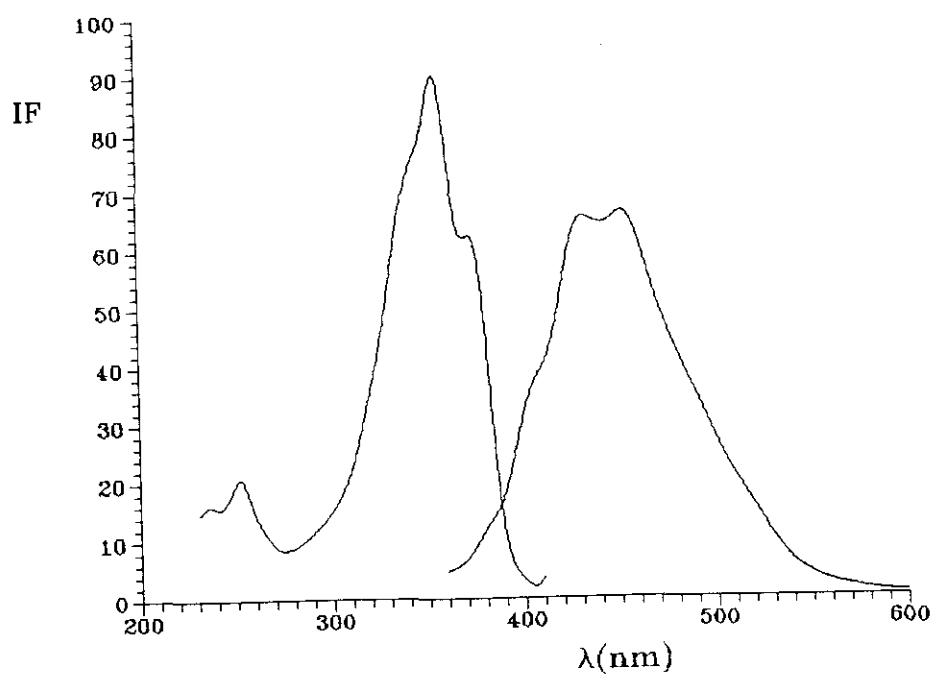


FIGURA 101B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) de la solución micelar de retinal/SDS, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

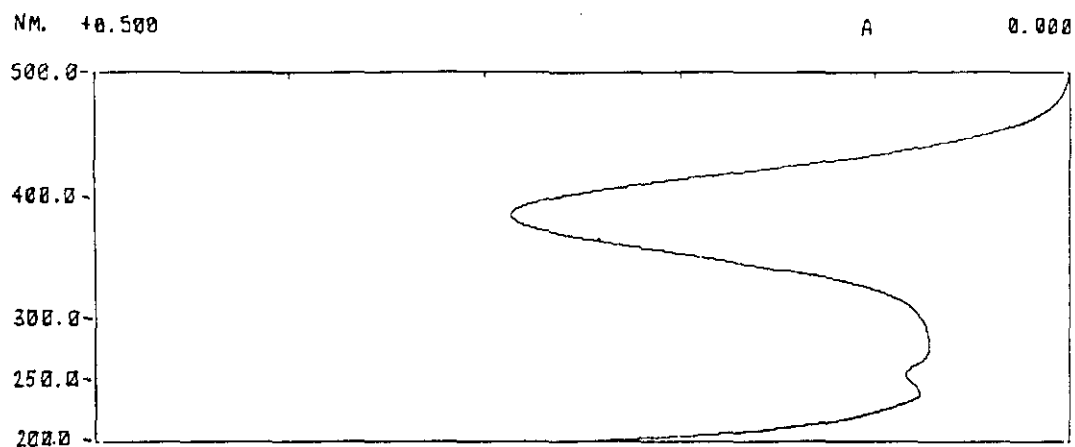


FIGURA 102A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinal/CTAB. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

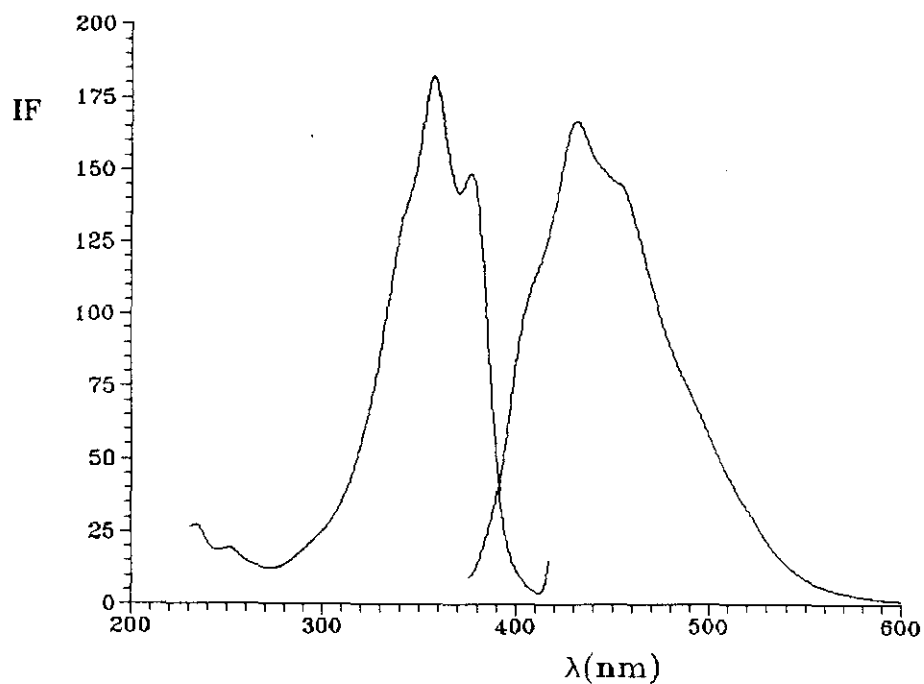


FIGURA 102B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$) de la solución micelar de retinal/CTAB, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

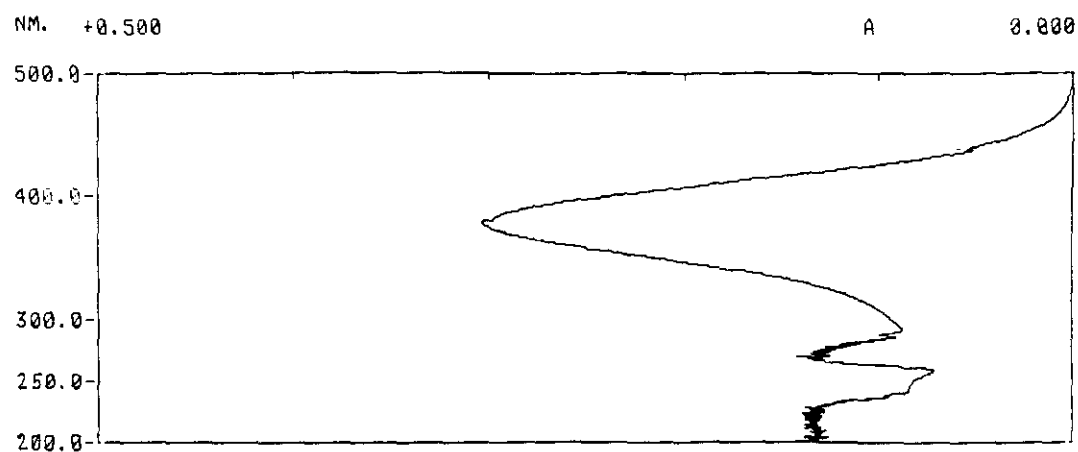


FIGURA 103A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinal/Triton X-100. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

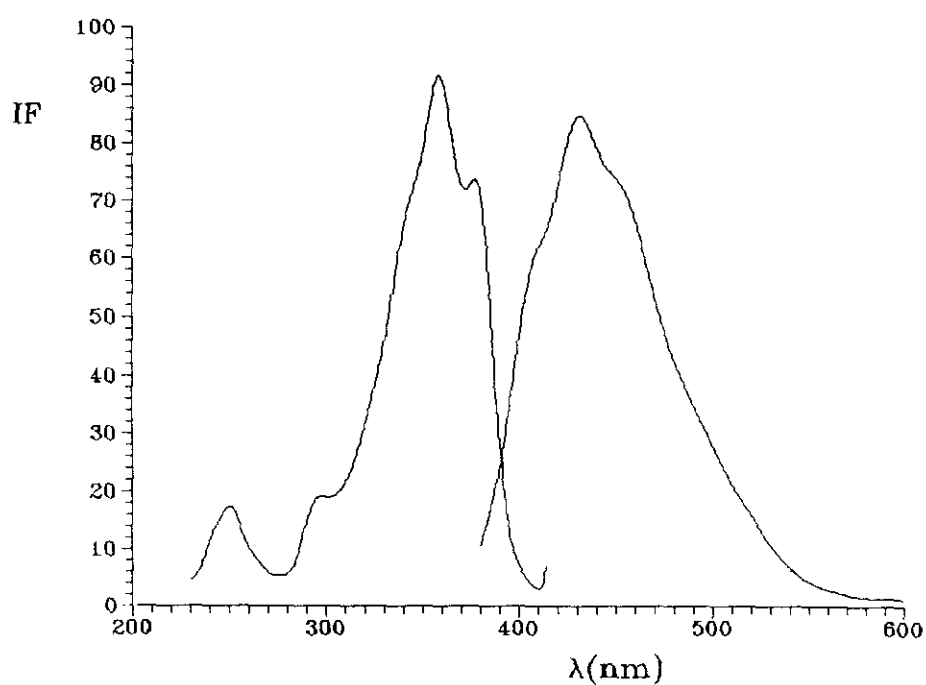


FIGURA 103B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 355 \text{ nm}$) de la solución micelar de retinal/Triton X-100, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

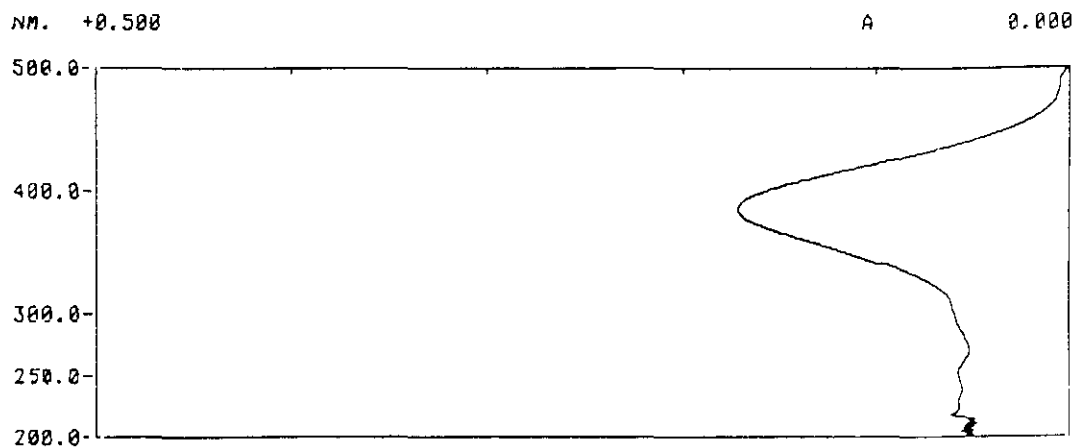


FIGURA 104A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinal/Brij-35. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm),

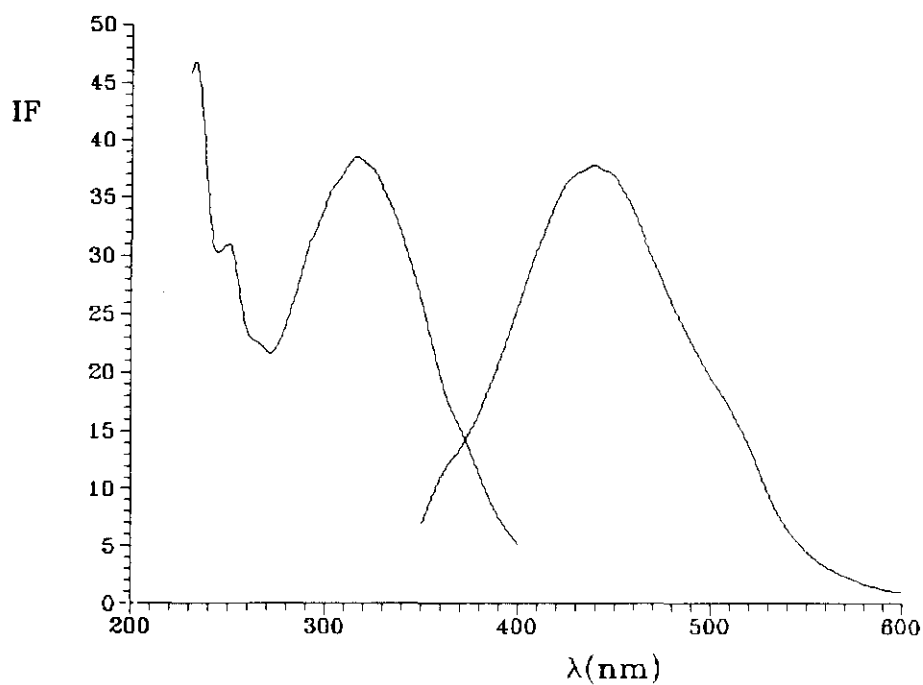


FIGURA 104B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 430$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 320$ nm) de la solución micelar de retinal/Brij-35, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

El perfil de los espectros de excitación y de emisión es muy semejante al que se obtiene para los complejos de inclusión con ciclodextrinas. En el espectro de excitación se muestra un máximo a 355-360 nm y un segundo pico de menor intensidad a 380 nm que pudiera en muchos casos atribuirse a la dispersión Raman. El espectro de emisión corresponde a una banda con un máximo a 435 nm y un hombro en muchos casos no bien resuelto en torno a 460-470 nm. En el caso del Brij-35 (FIGURA 104B), se observa que tanto los espectros de excitación como de emisión son anchos, con máximos situados a $\lambda_{ex} = 320$ nm y $\lambda_{em} = 430$ nm. En el espectro de emisión, aparece además un hombro en la región de 505-510 nm.

III.B.1.1.8 13-C/S RETINAL/MICELAS

Al igual que lo descrito anteriormente para el todo-*trans* retinal, la solubilización del isómero 13-*cis* es muy intensa en los distintos tensoactivos. En las FIGURAS 105A-108A se puede apreciar que la banda de absorción característica del retinal (≈ 380 nm) presenta una gran intensidad, es realmente estrecha y apenas se observa la aparición del pico de 280 nm.

A pesar de esta buena solubilización, que haría pensar en una intensa fluorescencia, en este caso las señales de fluorescencia observadas son más bajas (FIGURAS 105B-108B) que las obtenidas para este mismo compuesto en el caso de las ciclodextrinas, siendo particularmente significativa la débil señal observada en el caso del CTAB. Además esta intensidad de fluorescencia para este compuesto, es más baja que la obtenida en los mismos tensoactivos para su isómero, el todo-*trans* retinal.

Los máximos de excitación y de emisión fluorescente se sitúan igual que para el todo-*trans* retinal, a $\lambda_{ex} = 335$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm. El descenso en la intensidad de fluorescencia, comparada con la que se obtiene en el caso del isómero todo-*trans*, puede estar en relación con la geometría de la molécula de 13-*cis* retinal. Así pues, si bien puede quedar incluida en la fase micelar pero en la superficie, lo cual tiene como consecuencia la solubilización de la molécula, es posible que no penetre de forma eficaz salvo que se distorsione la micela, ya que en los isómeros *cis*, a diferencia del todo-*trans* retinal cuya cadena etilénica puede alojarse paralelamente a las cadenas apolares del tensoactivo, este

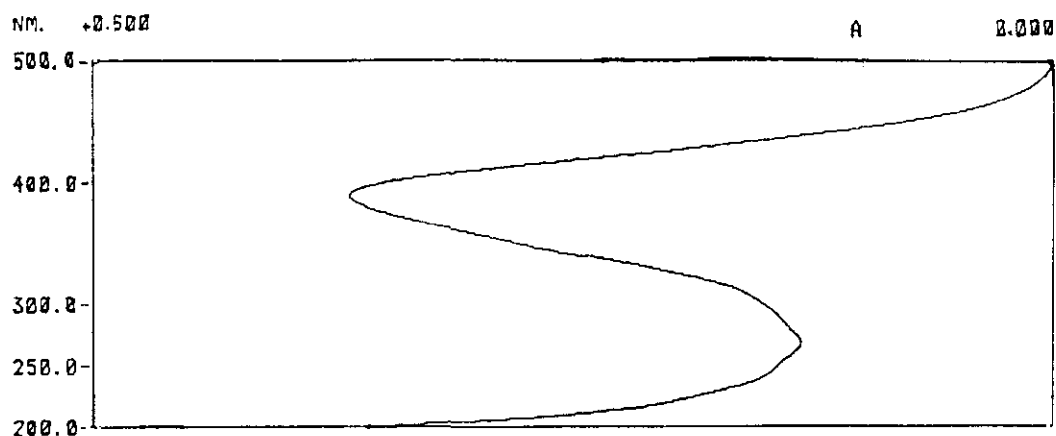


FIGURA 105A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 13-cis retinal/SDS. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

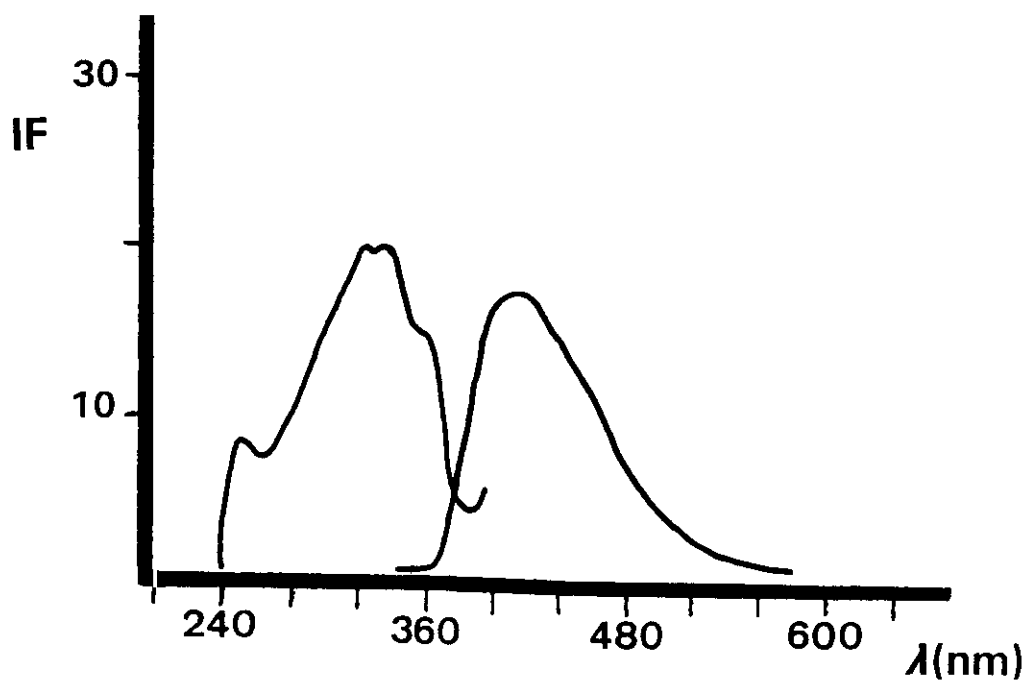


FIGURA 105B : Espectros de excitación ($\lambda_{em} \approx 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) de la solución de 13-cis retinal/SDS, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

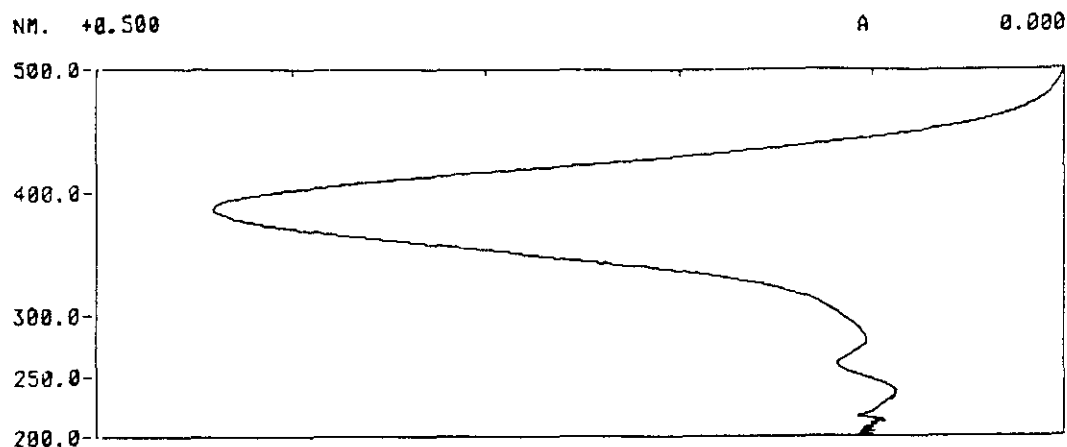


FIGURA 106A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 13-cis retinal/CTAB. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

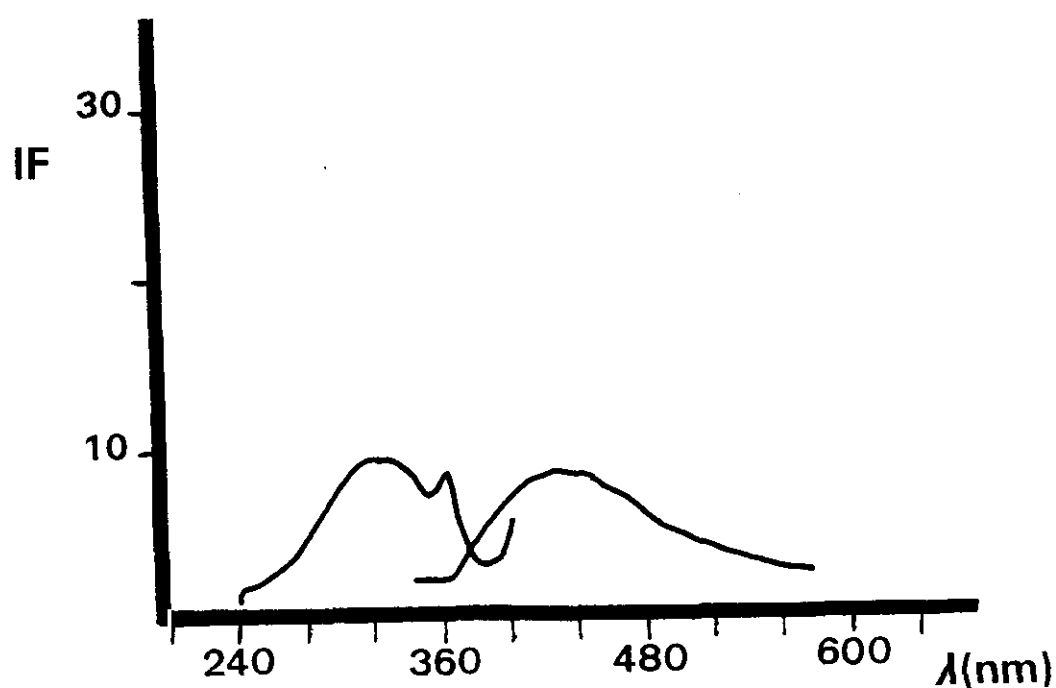


FIGURA 106B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) de la solución de 13-cis retinal/CTAB, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

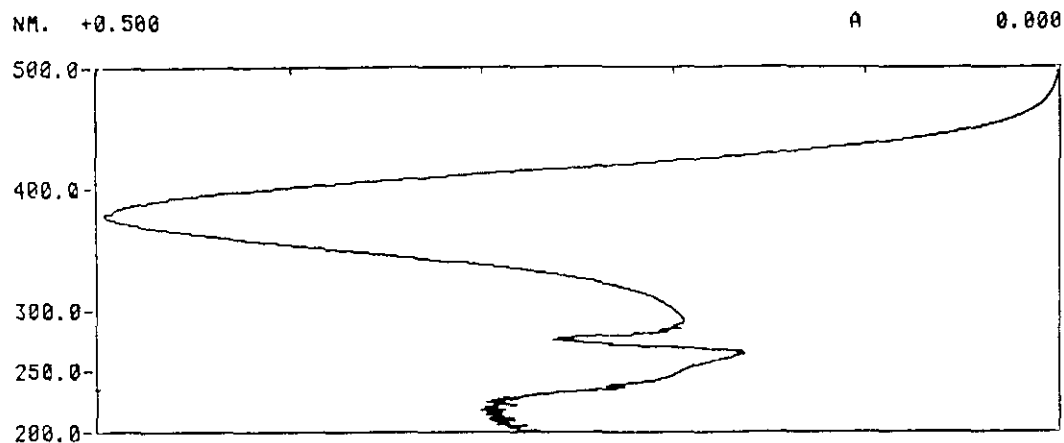


FIGURA 107A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 13-cis retinal/Triton X-100. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

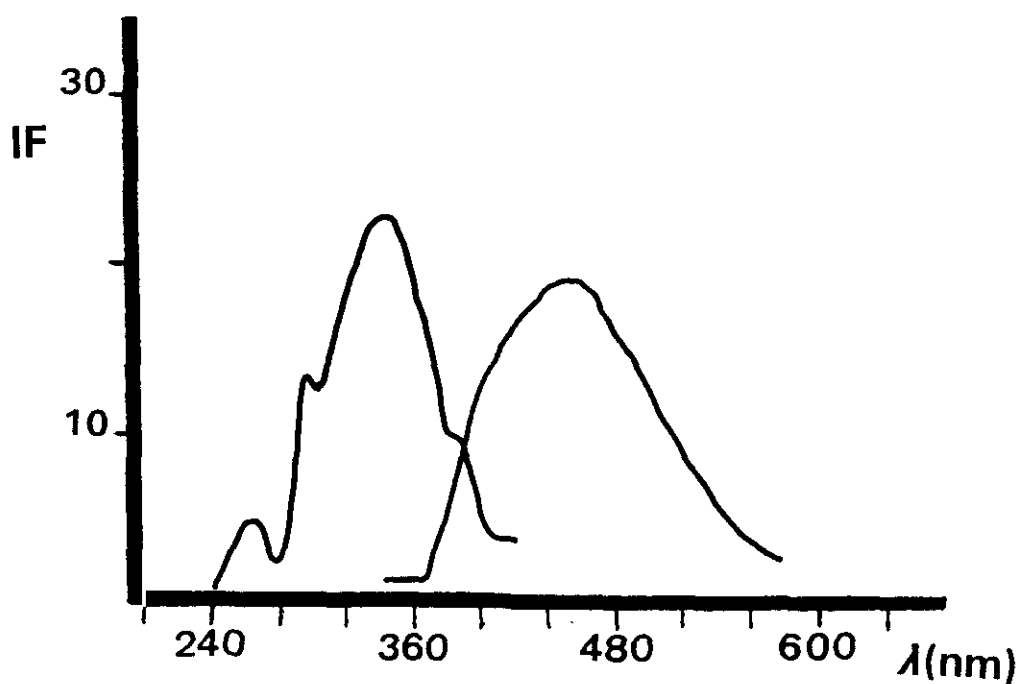


FIGURA 107B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) de la solución micelar de 13-cis retinal/Triton X-100, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

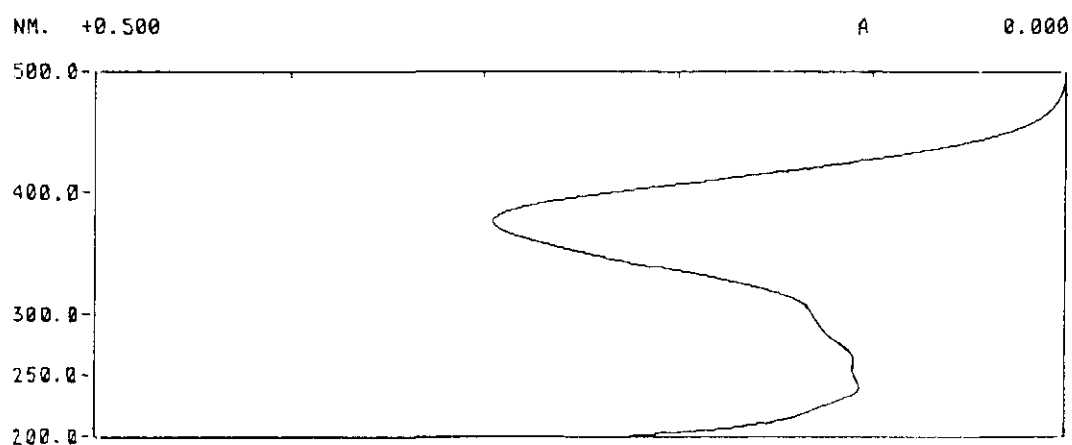


FIGURA 108A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 13-cis retinal/Brij-35. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

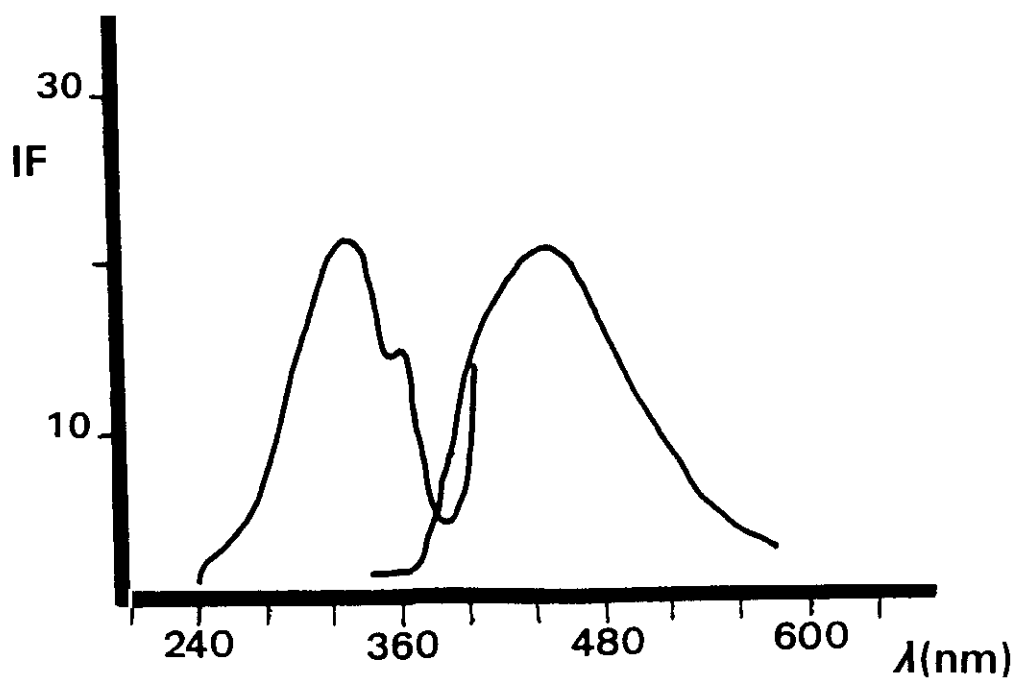


FIGURA 108B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 335$ nm) de la solución micelar de 13-cis retinal/Brij-35, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

alineamiento en paralelo con las cadenas del tensoactivo no es posible en el caso del 13-*cis* retinal.

III.B.1.1.9 9-C/S RETINAL/MICELAS

A diferencia de lo descrito en los dos apartados anteriores para el 13-*cis* y el todo-*trans* retinal, la solubilización del 9-*cis* para los distintos tensoactivos es mucho más baja. Como se puede apreciar en los espectros de absorción UV-VIS (FIGURAS 109A-112A) se presenta la banda de 380 nm, con una absorbancia menor que la obtenida en el caso de otros isómeros y además, este compuesto exhibe un pico de absorción a 280 nm, el cual para algunos autores está en relación con la geometría *cis* del isómero [1984 TL 1007].

En las FIGURAS 109B-112B se muestran los espectros de excitación y de fluorescencia para las soluciones de 9-*cis* retinal/tensoactivos. Los máximos de excitación y emisión no experimentan modificaciones significativas, ya que $\lambda_{ex} = 340$ nm, $\lambda_{em} = 420$ nm. Al igual que para los otros isómeros, los espectros de excitación, cuando el tensoactivo empleado es Triton X-100, son más complejos; este hecho podría ser atribuido a la estructura de las moléculas del tensoactivo.

III.B.1.1.10 ACETATO DE RETINILO/MICELAS

El acetato de retinilo, una molécula ligeramente más polar que el retinal, se solubiliza de forma efectiva en presencia de los distintos tensoactivos estudiados a concentración superior a la CMC; así se desprende de los espectros de absorción UV-VIS (FIGURAS 113A-116A). El máximo de absorción aparece a 330 nm, ligeramente desplazado (5 nm) con respecto a lo que se observa en solventes orgánicos. Además para este compuesto, así como para el retinol, se observa un hombro en la región de 400 nm con una débil absorbancia, así como la coincidencia con uno de los máximos (el que aparece a 400 nm) que se aprecia en el espectro de absorción de las soluciones de acetato de retinilo/SDS, donde la resolución espectral es mayor. A pesar de que la solubilización es considerable, sin embargo los valores de absorbancia no son tan elevados como los que se observan para el todo-*trans* retinal y sus isómeros geométricos.

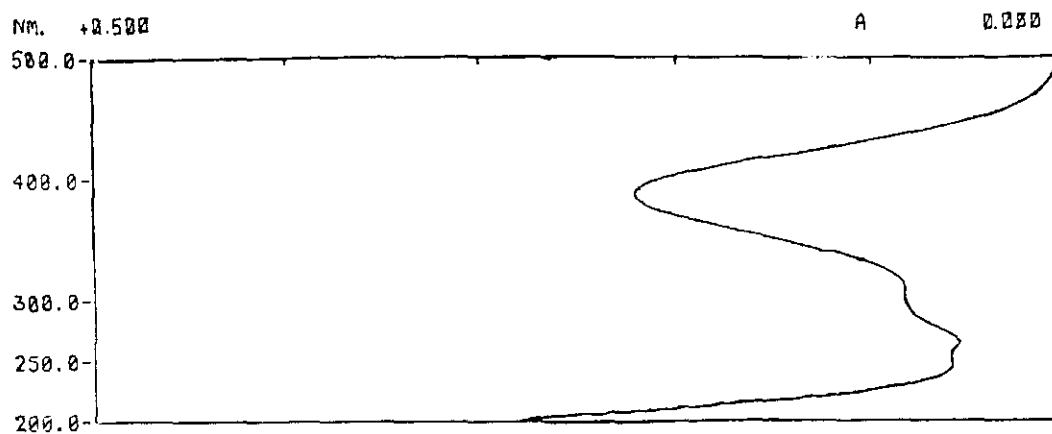


FIGURA 109A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 9-cis retinal/SDS. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

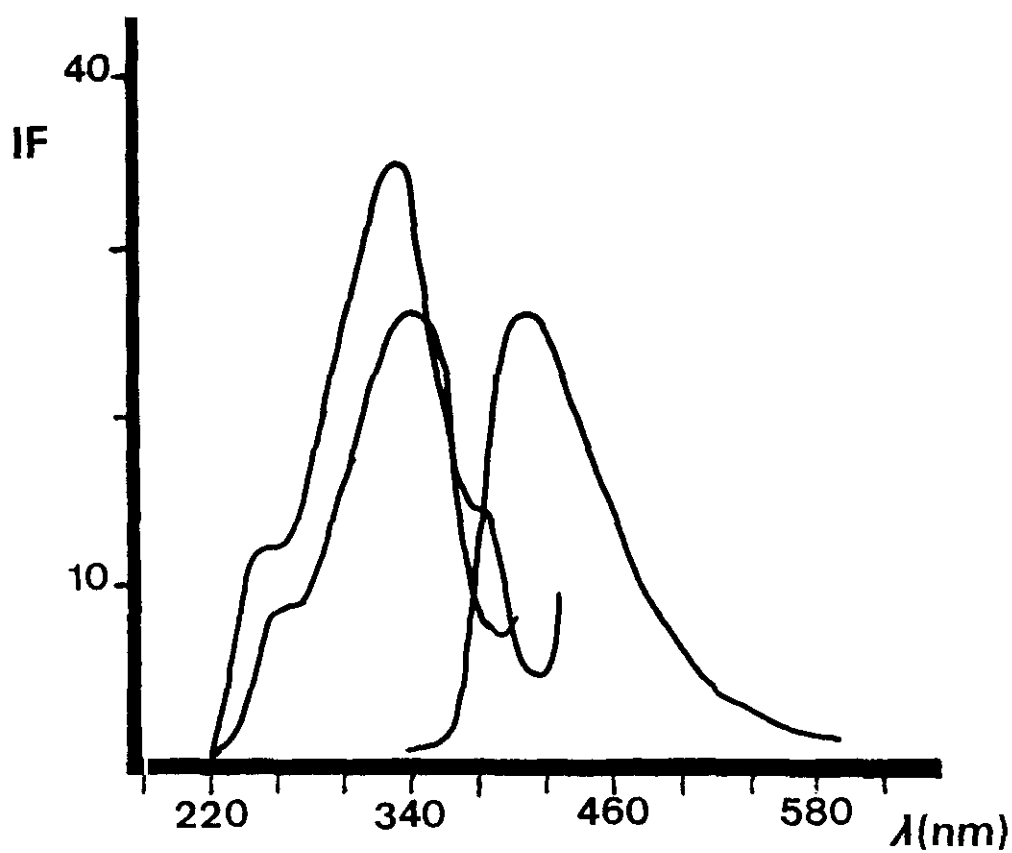


FIGURA 109B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) de la solución micelar de 9-cis retinal/SDS, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

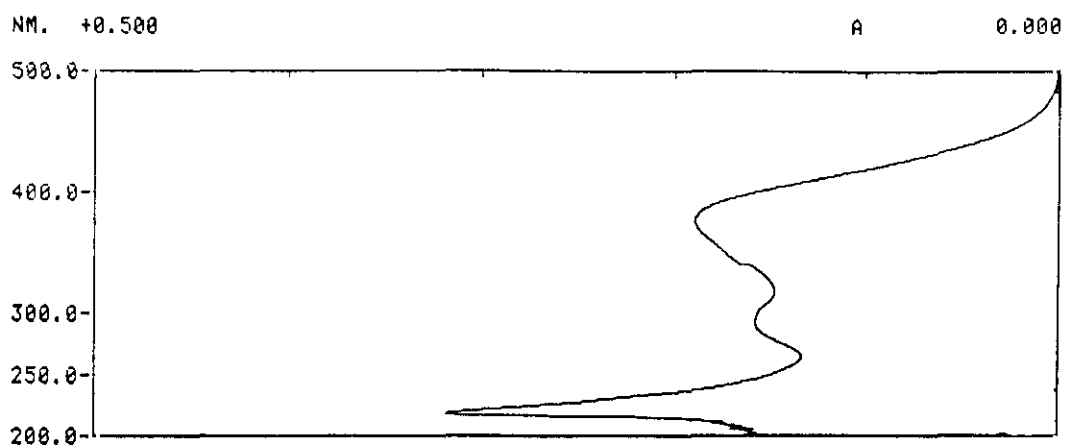


FIGURA 110A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 9-cis retinal/CTAB. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

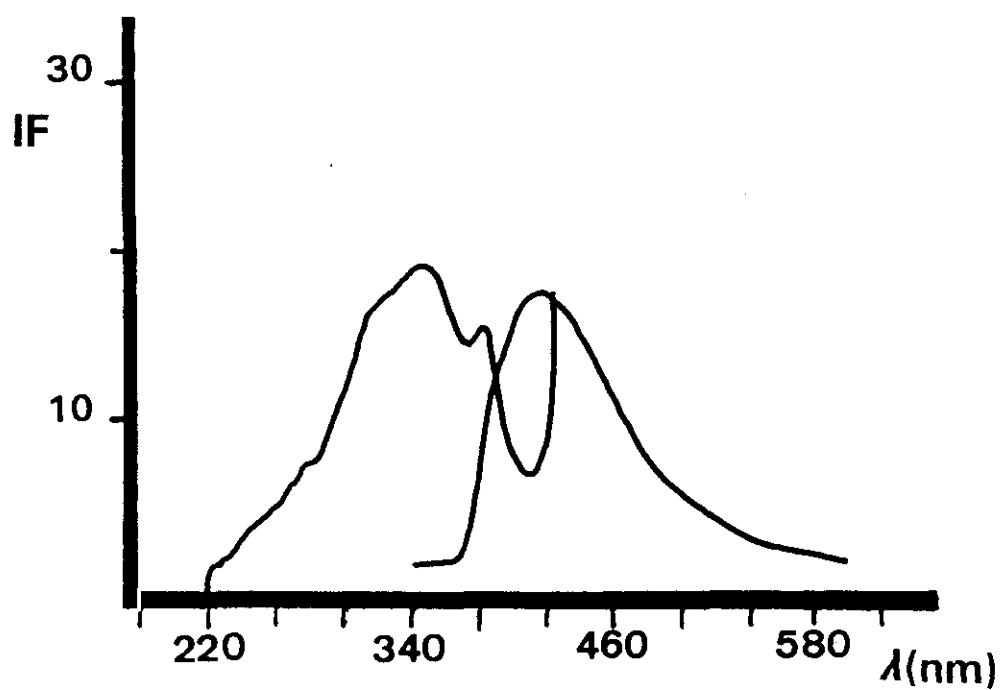


FIGURA 110B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) de la solución micelar de 9-cis retinal/CTAB, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

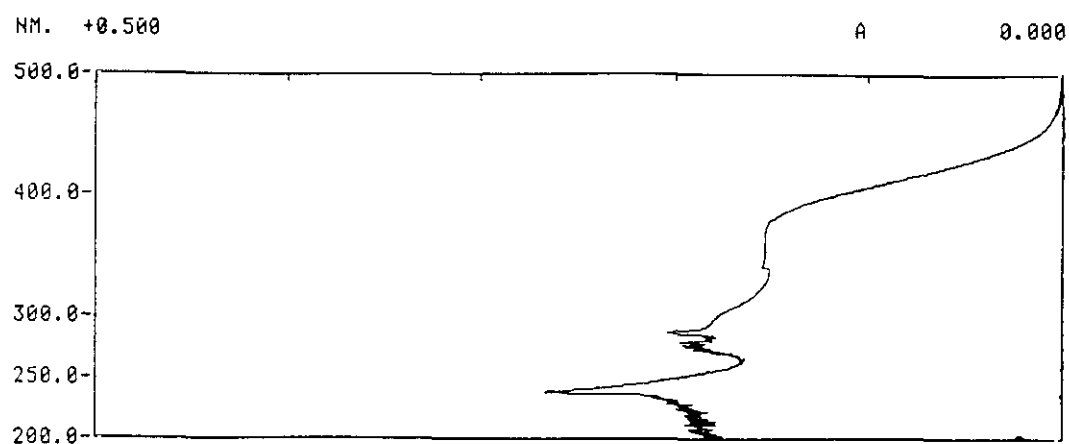


FIGURA 111A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 9-cis retinal/Triton X-100. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

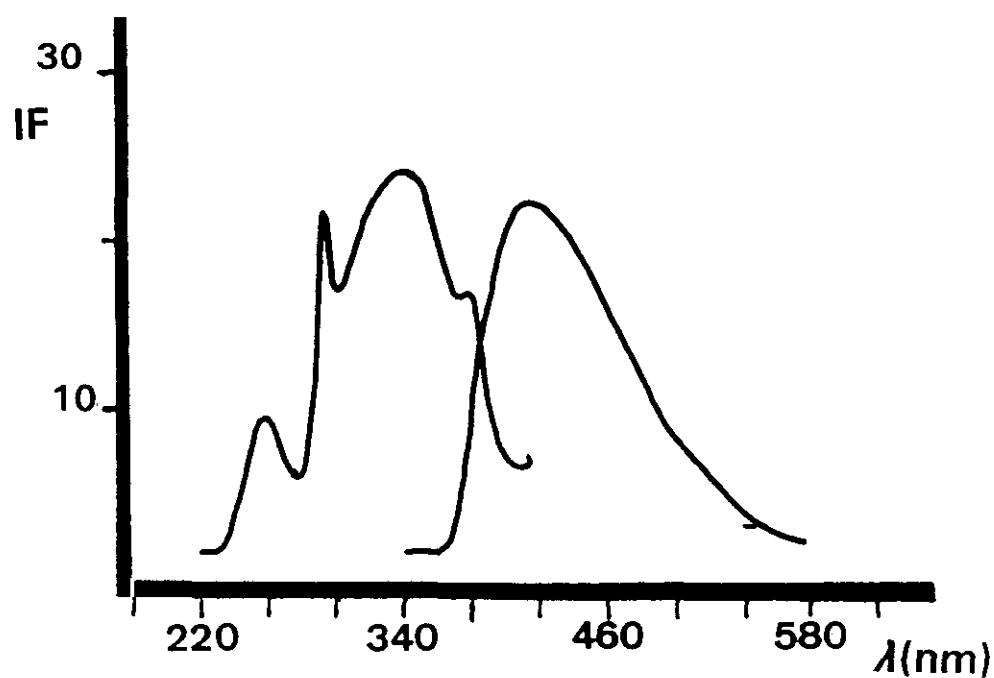


FIGURA 111B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) de la solución micelar de 9-cis retinal/Triton X-100, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

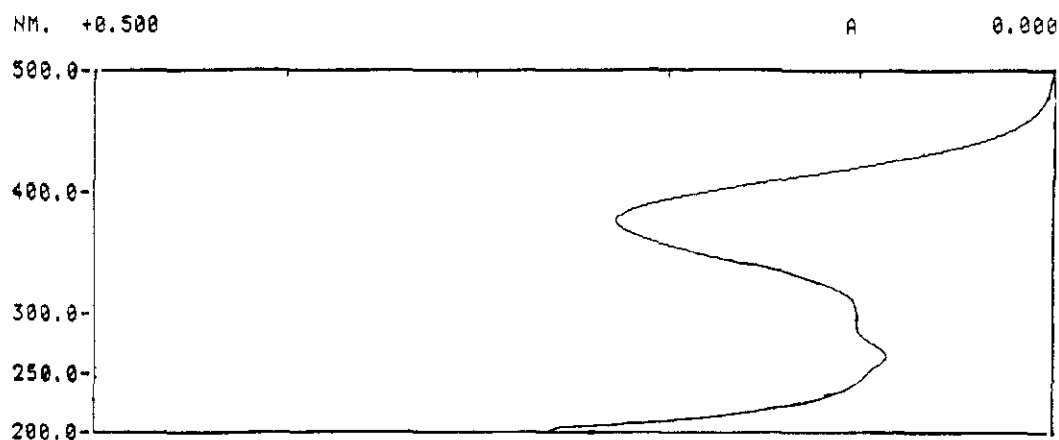


FIGURA 112A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de 9-cis retinal/Brij-35. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

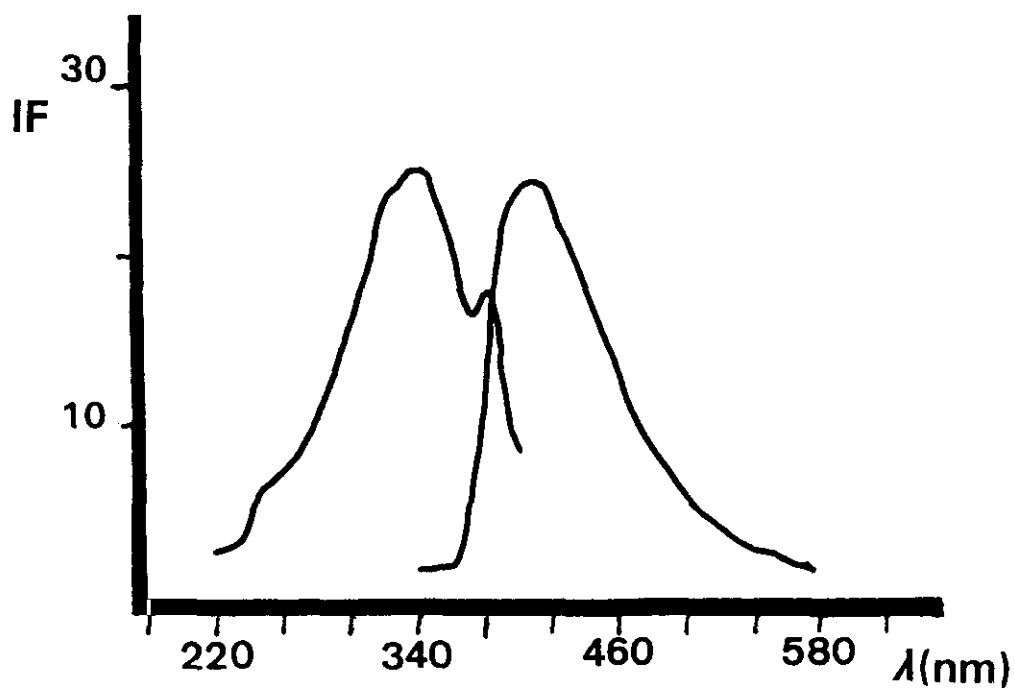


FIGURA 112B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 420$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) de la solución micelar de 9-cis retinal/Brij-35, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

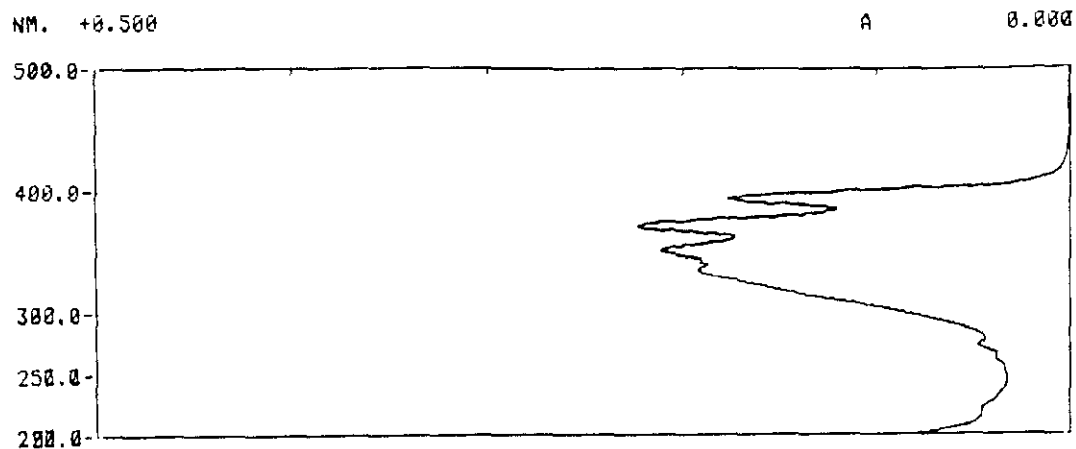


FIGURA 113A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de acetato de retinilo/SDS. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

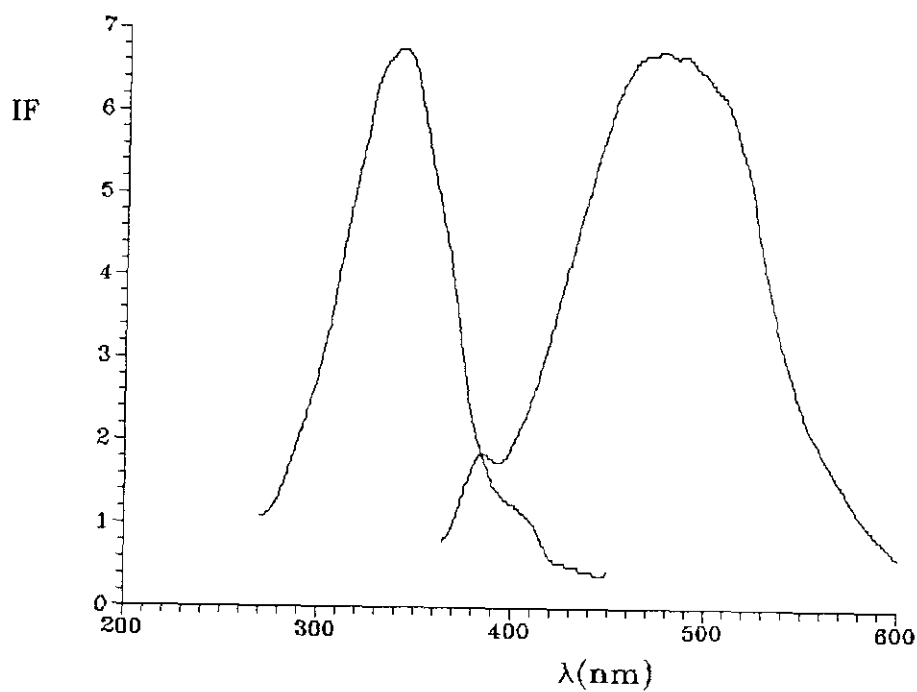


FIGURA 113B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) de la solución micelar de acetato de retinilo/SDS, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

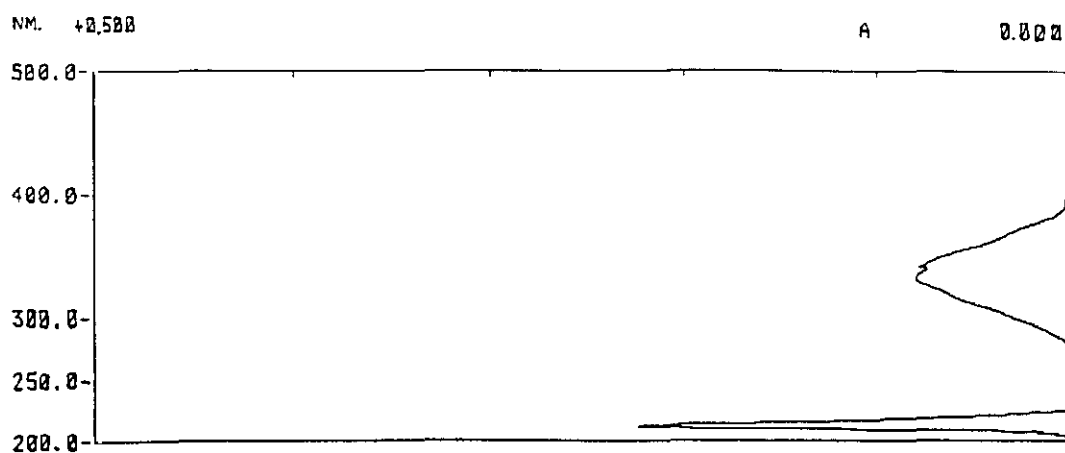


FIGURA 114A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de acetato de retinilo/CTAB. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

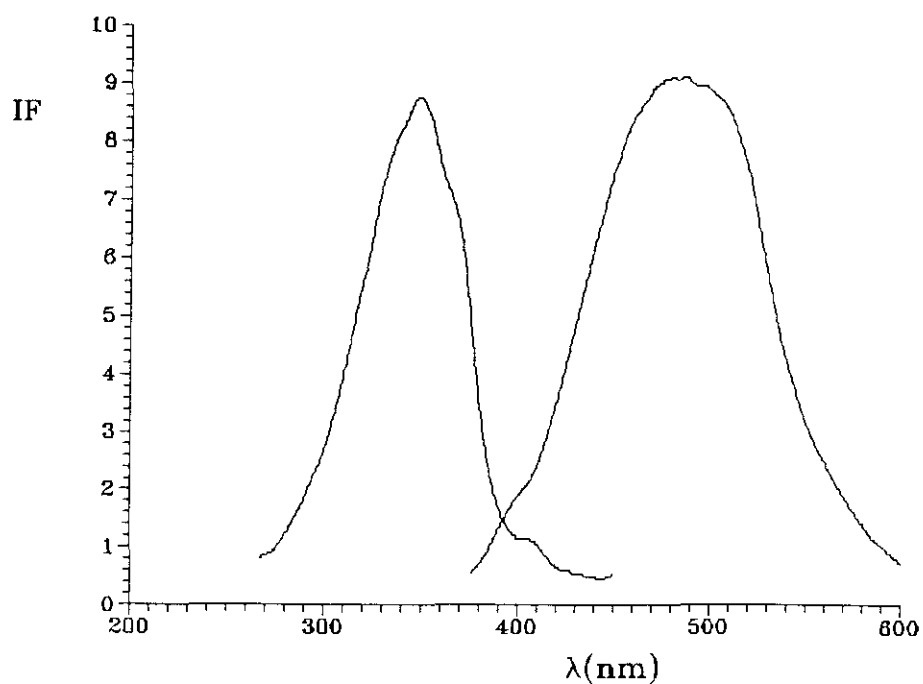


FIGURA 114B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 350$ nm) de la solución micelar de acetato de retinilo/CTAB, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

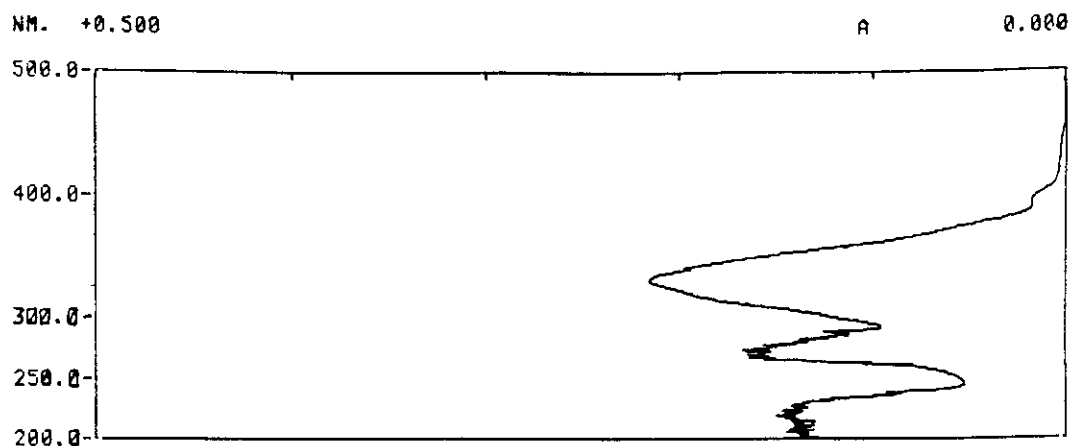


FIGURA 115A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de acetato de retinilo/Triton X-100. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

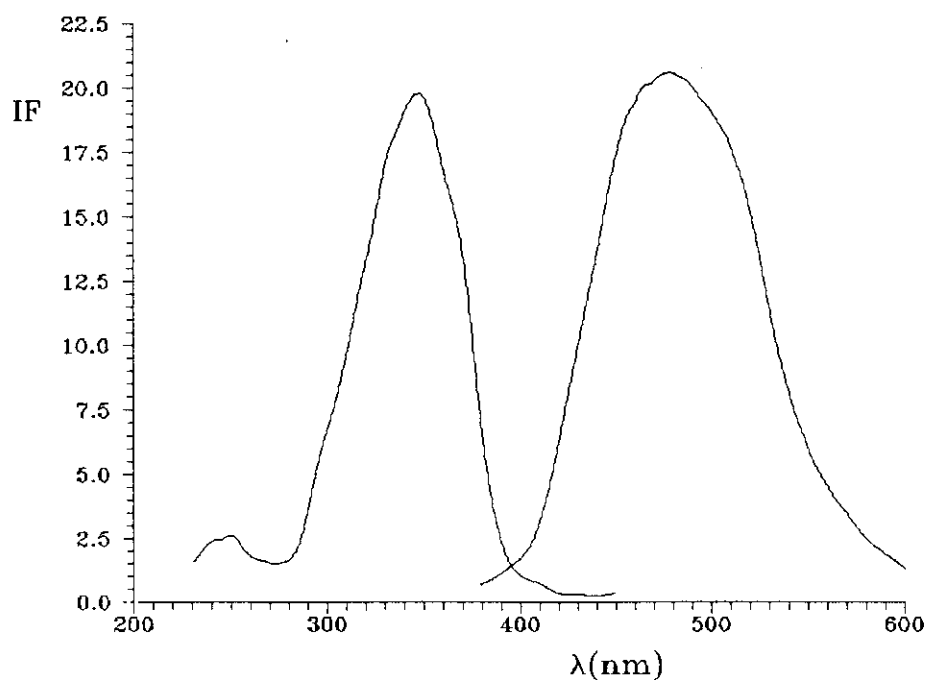


FIGURA 115B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 350$ nm) de la solución micelar de acetato de retinilo/Triton X-100, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

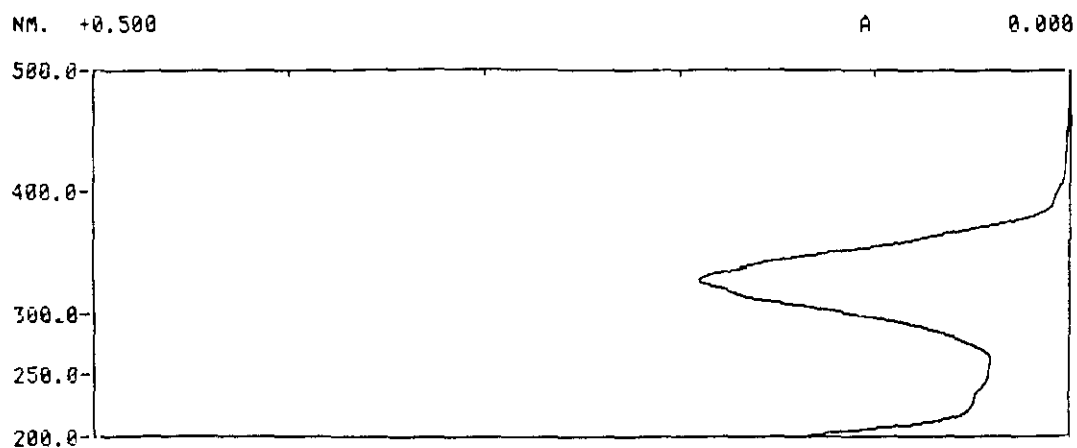


FIGURA 116A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de acetato de retinilo/Brij-35. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

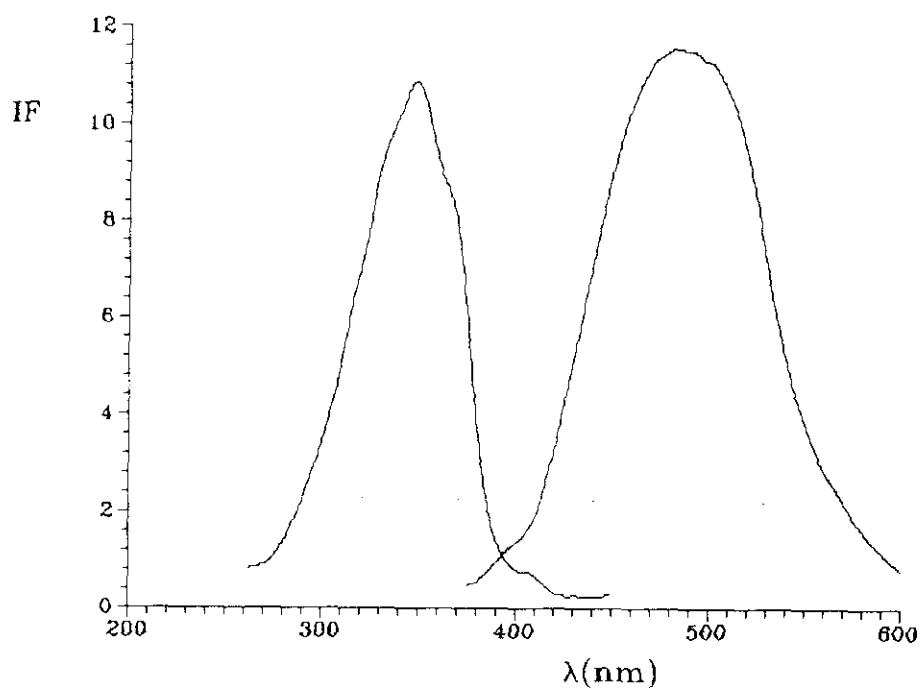


FIGURA 116B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475 \text{ nm}$) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$) de la solución micelar de acetato de retinilo/Brij-35, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

En el caso del SDS ha de señalarse, que tanto para el acetato de retinilo como para el retinol, se pueden apreciar unos picos agudos en el espectro de absorción UV-VIS y que guarda una gran similitud con el perfil espectral resuelto que se obtiene para los complejos de acetato de retinilo con β -CD e HP β -CD.

Las FIGURAS 112B-116B corresponden a los espectros de excitación y emisión fluorescente del acetato de retinilo solubilizado en distintos medios micelares. La intensidad de fluorescencia es semejante o más pequeña, en algunos casos, a la que se obtiene con las ciclodextrinas. El perfil espectral es semejante al que se logra con los distintos complejos de inclusión de acetato de retinilo, mostrando un máximo de excitación a 350 nm y una banda de emisión ancha, con un pico situado a 480 nm y en algunos casos puede intuirse un hombro en la región de 500-510 nm, de forma semejante a como se presenta en los complejos de inclusión con ciclodextrinas, aunque en este caso el perfil de emisión esté menos definido. La mayor intensidad de fluorescencia se presenta en el caso del Triton X-100, como cabría esperar dado que la absorbancia más elevada se presenta para este mismo tensoactivo.

III.B.1.1.11 RETINOL/ MICELAS

Los espectros de absorción UV-VIS del retinol en soluciones de tensoactivos (FIGURAS 117A-120A) muestran la banda intensa de absorción característica del retinol a $\lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$, con un pequeño desplazamiento con respecto al máximo que se presenta en solventes orgánicos. La solubilización es buena como lo demuestran los valores de absorbancia obtenidos, si bien en el caso de los tensoactivos no iónicos los valores de absorbancia son significativamente más bajos. En el caso del SDS se observa un perfil espectral más resuelto a longitudes de onda superiores a las del máximo de absorción (330 nm).

El retinol muestra una fluorescencia apreciable en la región de 480 nm cuando se halla solubilizado en los distintos tensoactivos estudiados (FIGURAS 117B-120B). El perfil espectral es muy similar en todos ellos. La banda correspondiente al espectro de excitación presenta un máximo en torno a 345-350 nm, dependiendo del tensoactivo y en algunos casos se puede observar un hombro a 380 nm. El espectro de emisión fluorescente consiste en una banda ancha con un máximo de emisión a 475-480 nm, que no es

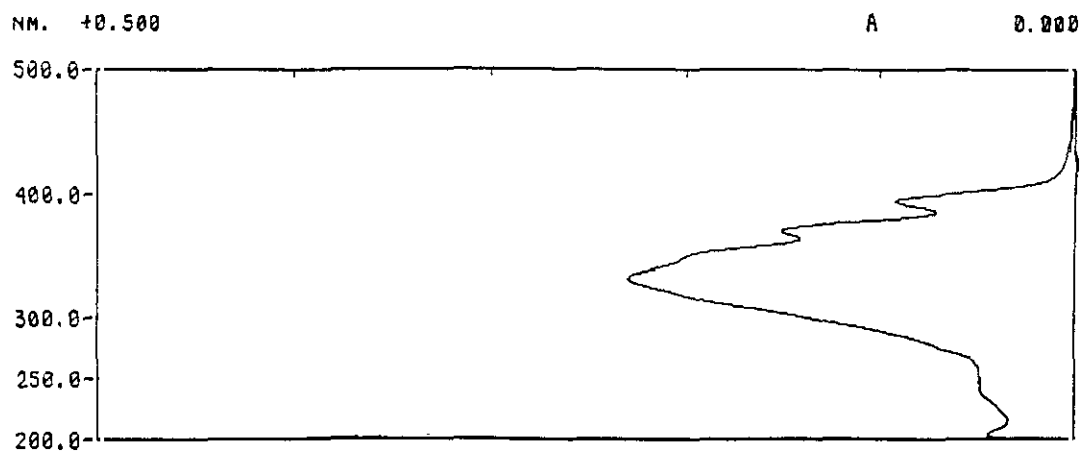


FIGURA 117A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinol/SDS. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

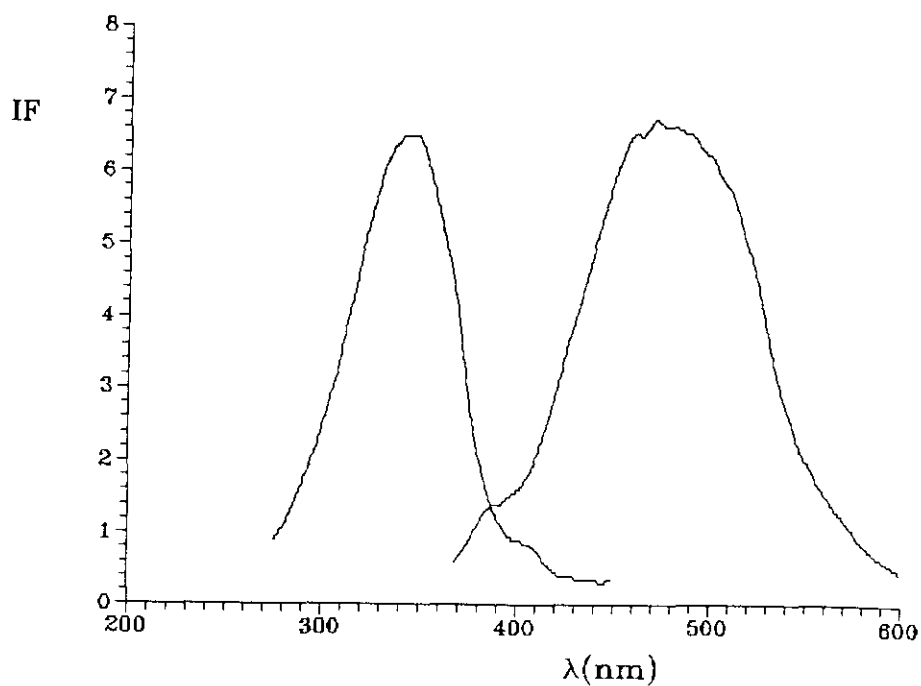


FIGURA 117B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 345$ nm) de la solución micelar de retinol/SDS, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

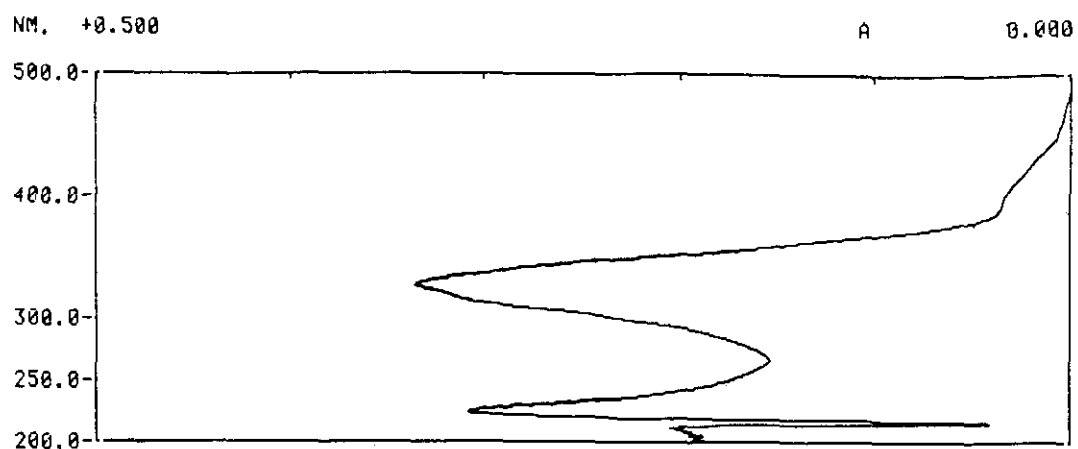


FIGURA 118A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinol/CTAB. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

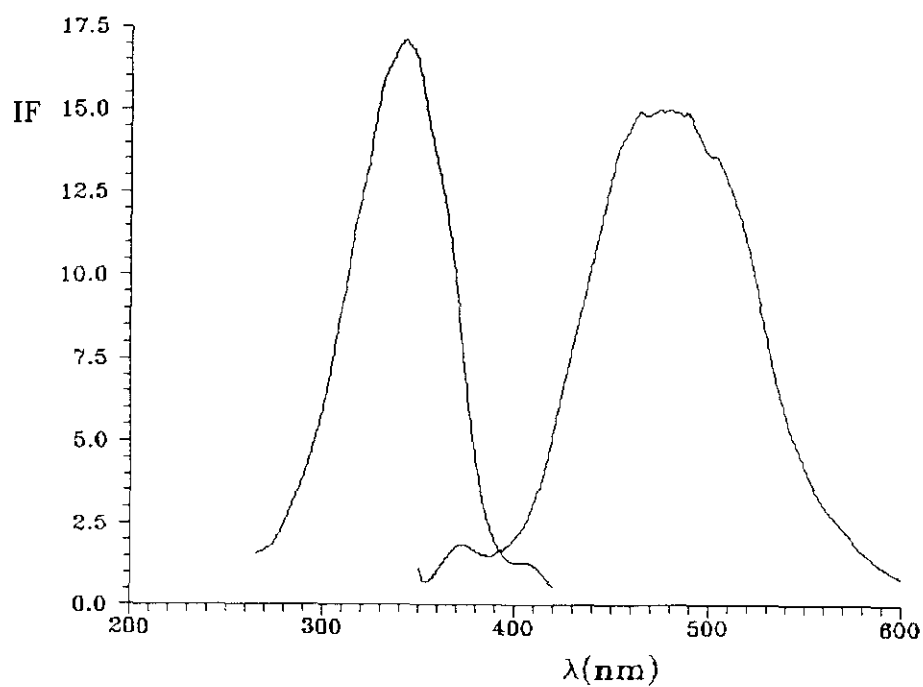


FIGURA 118B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} \approx 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 330$ nm) de la solución micelar de retinol/CTAB, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

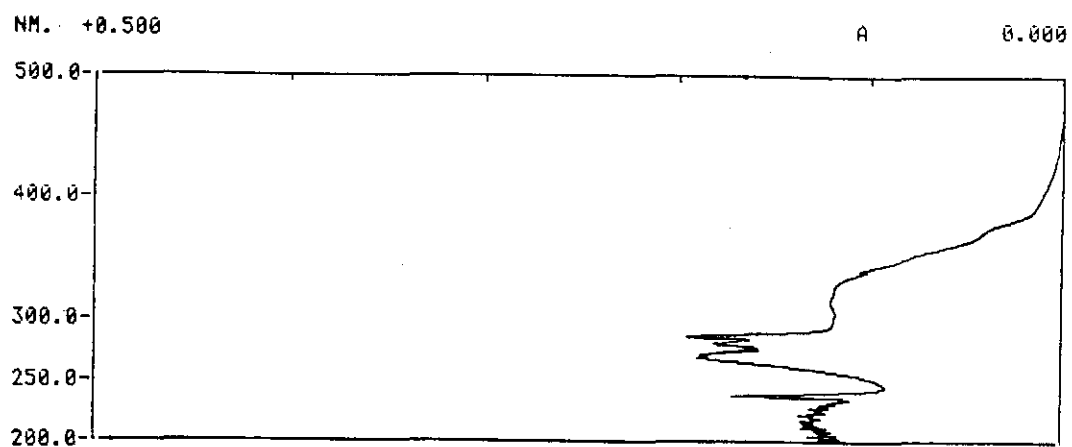


FIGURA 119A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinol/Triton X-100. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

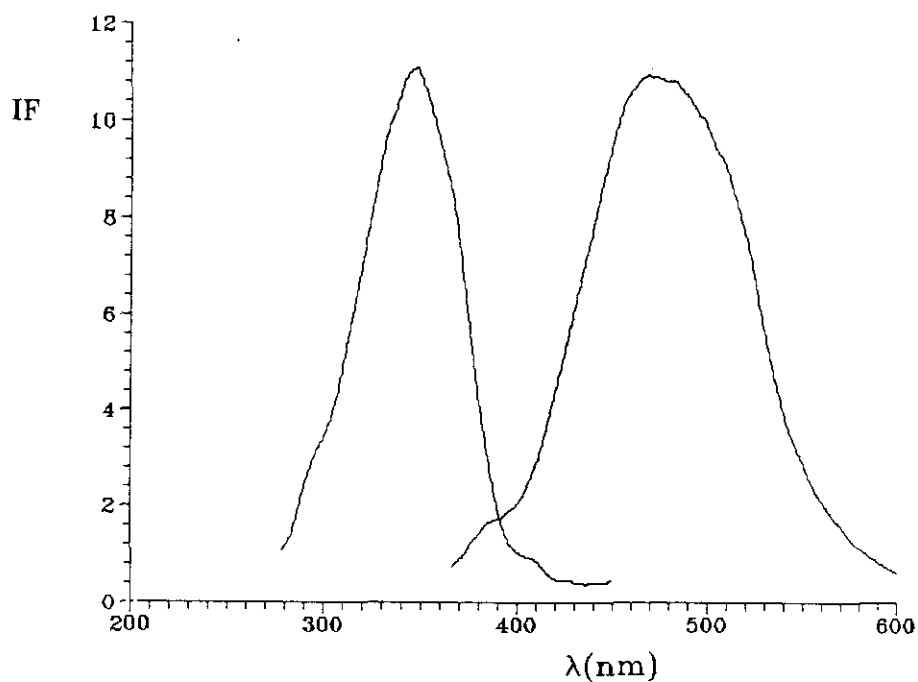


FIGURA 119B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 340$ nm) de la solución micelar de retinol/Triton X-100, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

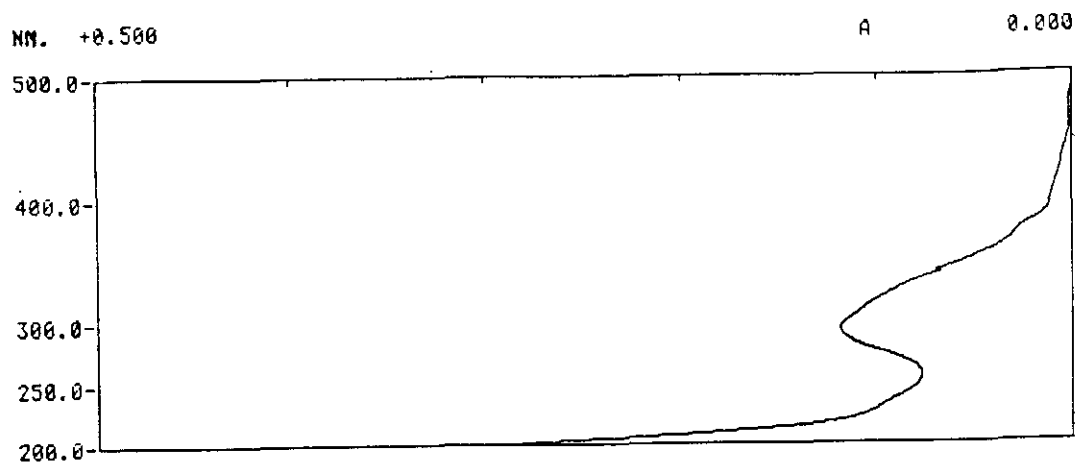


FIGURA 120A: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de retinol/Brij-35. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

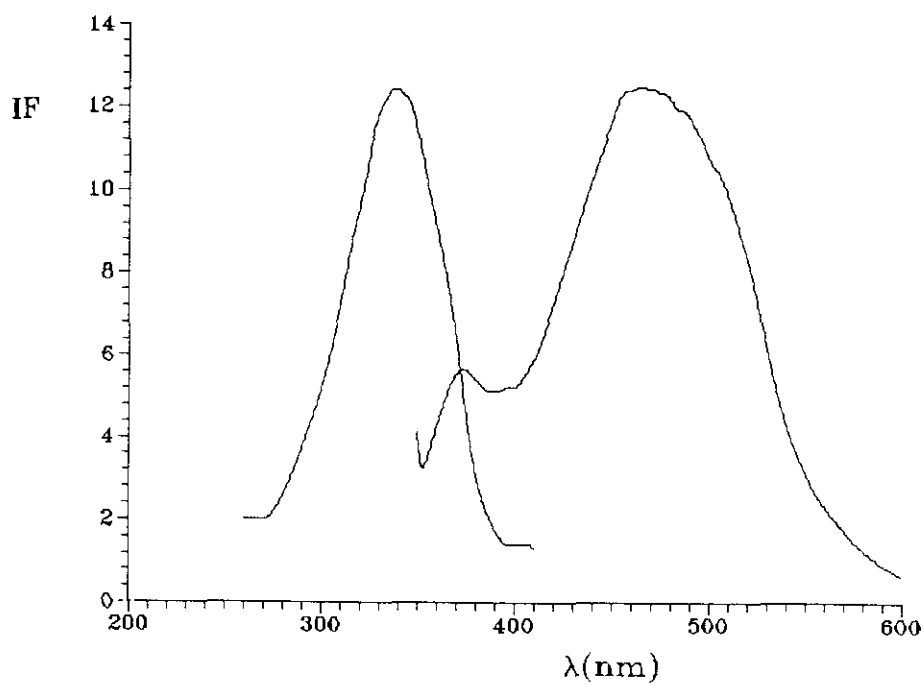


FIGURA 120B: Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 475$ nm) y emisión fluorescente ($\lambda_{ex} = 330$ nm) del retinol/Brij-35, IF: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias, λ : longitud de onda (nm).

simétrica respecto del máximo de excitación. Las intensidades de fluorescencia son muy similares para todos los medios micelares, siendo mayor la emisión en el caso del CTAB, como cabría esperar dado que el espectro de absorción presenta la absorbancia más alta comparada con los otros tensoactivos estudiados.

III.B.1.1.12 ACIDO RETINOICO/MICELAS

Las bandas de absorción (FIGURAS 121-124) del ácido retinoico solubilizado por acción de los tensoactivos son finas, con el máximo de absorción a 360 nm (excepto el CTAB que aparece 350 nm) y en general una absorbancia inferior a la que se observa para los otros retinoides solubilizados en las mismas soluciones micelares. Las soluciones de ácido retinoico con los distintos tensoactivos no presentaron fluorescencia apreciable.

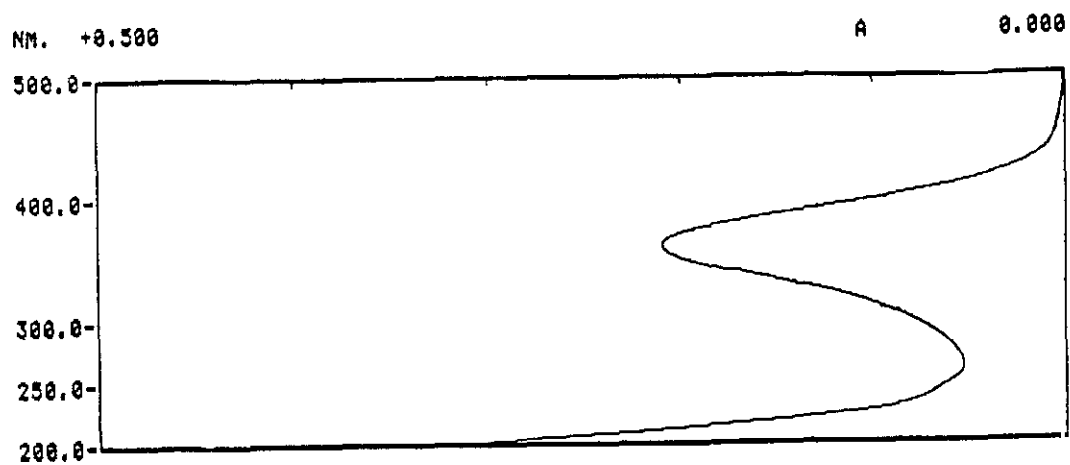


FIGURA 121: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de ácido retinoico/SDS. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

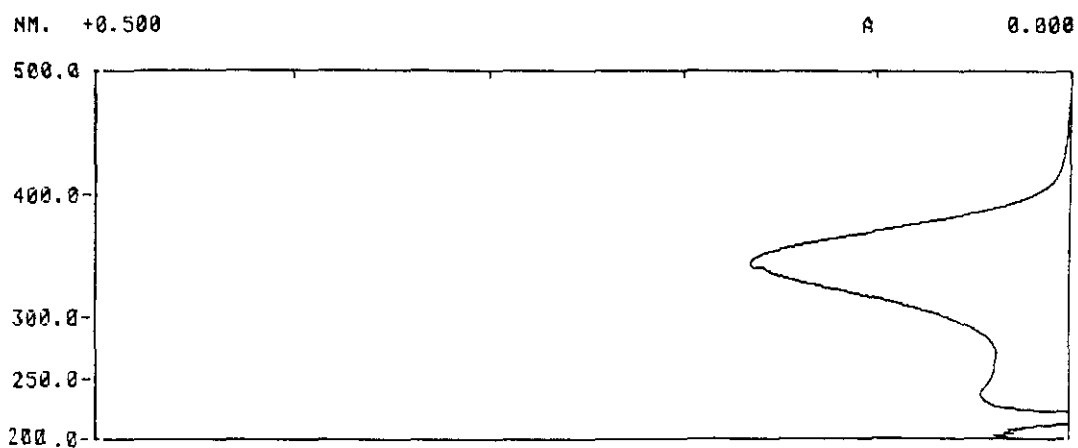


FIGURA 122: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de ácido retinoico/CTAB. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

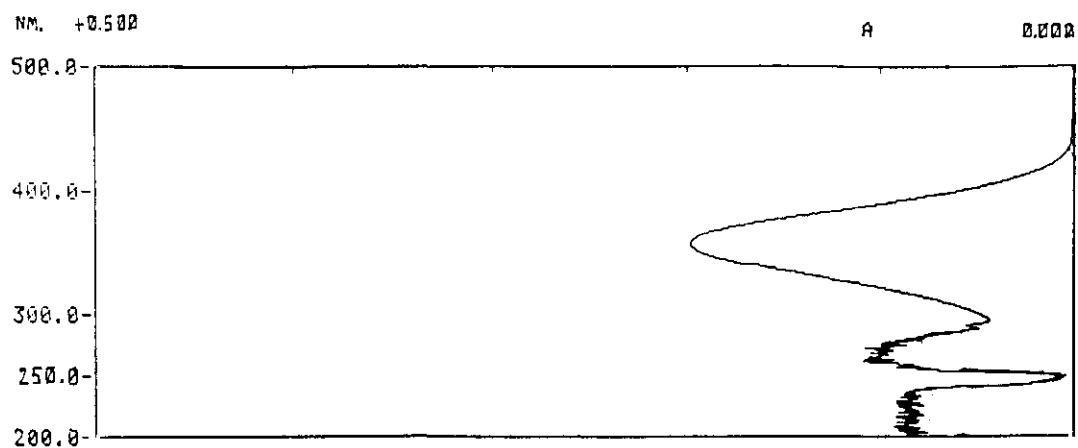


FIGURA 123: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de ácido retinoico/Triton X-100. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

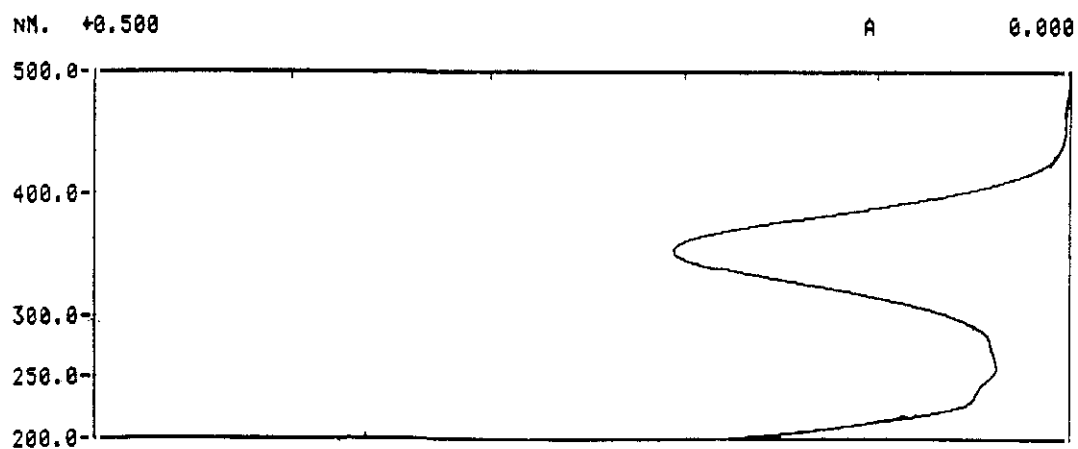


FIGURA 124: Espectro de absorción UV-VIS de la solución micelar de ácido retinoico/Brij-35. A: absorbancia, λ : longitud de onda (nm).

III.B.1.2 ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION POR RMN

III.B.1.2.1 ¹H-RMN DE LOS COMPLEJOS RETINOIDE/CD OBTENIDOS EN SOLUCION ACUOSA

En las FIGURAS 125-128 se presentan los espectros de ¹H-RMN a 250 mHz de la β-CD y la HPβ-CD puras así como de los complejos formados con los distintos retinoides en soluciones de D₂O (FIGURAS 129-133). Como ya se ha indicado en el apartado III.A.2.1 se prepararon los complejos a distintas concentraciones de retinoide, seleccionándose un valor de concentración de 4x10⁻³ M. A esta concentración, las soluciones obtenidas no son completamente transparentes, debido a que el complejo de inclusión es más insoluble en D₂O que en H₂O. Se registraron los espectros de las soluciones obtenidas antes y después de la filtración en el caso de los complejos β-CD y retinal, y se comprobó en el espectro que no existían diferencias significativas entre las suspensiones obtenidas inicialmente y las soluciones filtradas (FIGURAS 134 y 135).

En estas condiciones experimentales, si se comparan los espectros de ¹H-RMN obtenidos para los complejos de inclusión con los de las ciclodextrinas puras a la misma concentración, se aprecian ligeras modificaciones en el perfil espectral, aunque las posiciones de los picos de absorción no se alteran de forma muy significativa. Este hecho se comprueba si se comparan los valores de desplazamiento químico de los distintos protones para las soluciones de ciclodextrina pura y las de los correspondientes complejos (TABLAS V y VI).

Dado que la concentración de ciclodextrina en solución es muy superior a la concentración de los retinoides, se estudiaron las variaciones del valor de δ para los protones correspondientes a la ciclodextrina, según la asignación descrita en la bibliografía [1977 JACS 1735]. Otra posibilidad consistiría en estudiar las variaciones de δ correspondientes a los distintos protones de los retinoides y compararlos con los valores de soluciones de retinoides puros. Sin embargo, debido a la extrema insolubilidad de estos compuestos en agua, resulta imposible lograr alcanzar una concentración de retinoide disuelto que permita su detección por ¹H-RMN, técnica instrumental de gran utilidad en análisis estructural pero de escasa sensibilidad.

Si se comparan los espectros de absorción ¹H-RMN de los complejos y de las ciclodextrinas de partida, puede afirmarse que las modificaciones en el perfil son apreciables; así, los picos que aparecen asignados a las soluciones de CD como

correspondientes a los protones H_{6a} y H_{6b} , en los complejos correspondientes con los distintos retinoides, se convierten en general en un solo pico. Por otra parte, a la vista de los cambios en el valor de δ , parece ser que la inclusión afecta de igual manera tanto a los protones que quedan orientados hacia el interior de la cavidad (H_3 y H_5) como a los que se orientan hacia el exterior.

En el caso del retinal, se prepararon los complejos con distintas concentraciones de retinal (1×10^{-3} M - 8×10^{-3} M) con la finalidad de poder calcular la constante de asociación en función de las variaciones que se produjesen para δ [1977 JACS 5146]. No se pudo establecer una relación cuantitativa entre las variaciones de δ y la concentración de sustrato capaz de ser incluida, lo que impidió el cálculo de las citadas constantes. Las variaciones de δ , como consecuencia del incremento en la concentración de retinal, no excedieron de $\Delta\delta = 0.01$. Hay que señalar, sin embargo, que el perfil del espectro de absorción cambia notablemente a medida que se incrementa la concentración de retinal, como puede apreciarse al comparar la FIGURA 132 y las FIGURAS 136-139 correspondientes a la β -CD pura y los complejos de retinal/CD para unas concentraciones de retinal comprendidas entre 2×10^{-3} M y 8×10^{-3} M. La formación del complejo de inclusión debe afectar y modificar los valores de δ para la ciclodextrina, cuanto mayor es la concentración de sustrato. En nuestro caso esta variación, así como el cambio en el perfil espectral, permite afirmar que se ha formado el complejo de inclusión, no siendo posible no obstante determinar la constante de asociación por RMN.

III.B.1.2.2 ^1H -RMN DEL COMPLEJO AISLADO RETINAL/ β -CD

El complejo sólido retinal/ β -CD, aislado tal y como se describe en el apartado III.A.2.1, se disolvió en dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d_6) y se obtuvo el espectro de absorción ^1H -RMN (FIGURA 140). Igualmente se obtuvo el espectro de la β -CD (FIGURA 141) utilizada para este ensayo y disuelta en DMSO deuterado

Si se comparan ambos espectros se puede apreciar, además de un cambio en el perfil espectral como consecuencia de la inclusión del retinal, variaciones significativas en el valor de δ así como en las constantes de acoplamiento. La presencia de la banda de absorción del agua, de gran intensidad situada a $\delta = 3.42\text{--}3.44$ ppm, enmascara las señales debidas al protón H_2 . Igualmente las señales correspondientes a H_3 quedan englobadas en las correspondientes a H_6 (FIGURA 142).

No se produce variación en el valor de δ para H_1 , H_2 , H_3 y H_4 , apareciendo las señales de estos protones mejor resueltas en el caso de la β -CD pura, que en el caso del complejo. Sin embargo, en el caso de H_5 se produce una variación significativa en el valor de δ ($\Delta\delta = 0.04$ ppm) (TABLA VII) y además se modifica de forma muy notable el valor de la constante de acoplamiento, pasando de ser $J = 12.34$ Hz en la solución de β -CD pura a $J = 5.62$ Hz para el complejo.

Dado que la modificación más importante, y que es perceptible en nuestras condiciones experimentales, se produce para el protón H_5 en el caso del complejo aislado, podemos concluir que el retinal se encuentra alojado en el interior de la cavidad de la CD. Es muy probable que se produzcan modificaciones similares para el H_3 pero en nuestras condiciones experimentales no pudieron detectarse, debido a que queda solapado con otras señales. No obstante, esta información constituye una prueba inequívoca de la formación del complejo de inclusión. Asimismo el hecho de que la inclusión afecte principalmente al valor de J , implica que la estructura del anillo de la ciclodextrina se deforma como consecuencia de los procesos de inclusión.

En este punto cabe preguntarse por qué son observables estas modificaciones en el complejo aislado y disuelto en DMSO y no lo son para el mismo complejo disuelto en agua. Pensamos que a pesar de tratarse del mismo complejo y con idéntica concentración de retinal (4×10^{-3} M), en el caso de la solución acuosa coexiste en solución una gran cantidad de CD disuelta y libre, ya que las condiciones para la formación del complejo de inclusión implican que la concentración de ciclodextrina sea superior a la de retinoide. El exceso de CD disuelta y libre hace que las bandas de absorción características de la CD libre, comparadas con las de la ciclodextrina que forma un complejo con el retinal sean mayoritarias, lo cual explica la modificación en el perfil de absorción, pero no la aparición de variaciones notables, tal y como se aprecian cuando el complejo en solución es mayoritario. Hemos de tener en cuenta que incluso en el complejo aislado puede ser que exista una pequeñísima proporción de CD libre, ya que el precipitado no fue lavado con H_2O , sino simplemente filtrado y en los líquidos de filtrado debe permanecer la CD libre disuelta.

En la FIGURA 143 se muestra el espectro de absorción UV-VIS del complejo de inclusión retinal/ β -CD aislado y con el que se realizaron los estudios de 1H -RMN y ^{13}C -RMN. El complejo se disolvió en agua y según se aprecia en la FIGURA 143, la banda de absorción UV-VIS correspondiente a este complejo es muy ancha y con un máximo situado a $\lambda_{max} = 396$ nm, mostrando un desplazamiento batocrómico significativo con respecto a

los máximos de los complejos que se obtienen en solución acuosa ($\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$). El perfil de absorción no exhibe el máximo de 280 nm. El ensanchamiento en la banda así como el desplazamiento del máximo pueden atribuirse también a efecto de concentración.

III.B.1.2.3 ^{13}C -RMN DEL COMPLEJO AISLADO RETINAL/ β -CD

En las FIGURAS 144-147 se muestran los espectros ^{13}C -RMN de la β -CD pura y del complejo aislado retinal/ β -CD disueltos ambos en DMSO, tras un número de acumulaciones de 522 y 133 respectivamente. Igualmente la FIGURA 148 muestra la superposición de las bandas de absorción de los 6 carbonos correspondientes a las unidades de glucopiranosas en la β -CD. La asignación concuerda con los datos bibliográficos [1974 JACS 8081] [1988 L LVI].

Se puede apreciar que las señales aparecen a campos más altos (menores valores de δ) para el complejo de inclusión con respecto a la β -CD. En la TABLA VIII se presentan los valores de desplazamiento químico para el complejo y la ciclodextrina de partida así como el valor de $\Delta\delta$. La mayor variación corresponde al carbono C_1 con un valor de $\Delta\delta$ de 2'12.

Ha de tenerse presente que si se comparan con los valores de $\Delta\delta$ obtenidos para el mismo complejo por ^1H -RMN, numéricamente son más importantes las variaciones que se obtienen en el espectro de RMN de ^{13}C , lo cual se puede apreciar de forma visual en el registro gráfico. No obstante, las modificaciones pueden considerarse del mismo orden, si se tiene en cuenta que la escala en ^1H -RMN es de 10 ppm mientras que en ^{13}C -RMN es de 200 ppm. En consecuencia, un $\Delta\delta$ de 0'04 ppm para H_5 en la resonancia protónica es prácticamente equivalente a un $\Delta\delta$ de 2'12 para C_1 en la resonancia de ^{13}C . De todo ello puede concluirse que las modificaciones observadas por ^{13}C -RMN vienen a confirmar la formación del complejo de inclusión entre la β -CD y el retinal, si bien gracias a la expansión de la escala y a la ausencia de superposición de señales, estas variaciones se aprecian mejor por ^{13}C -RMN.

Por último ha de señalarse que se realizó el espectro de ^{13}C -RMN del retinal puro disuelto en DMSO (FIGURA 149) con la finalidad de estudiar el "Nuclear Overhauser Effect" (NOE) sobre los metilos del retinal en las posiciones 16 y 17 (FIGURA 2) que deberían verse afectados por el proceso de inclusión. Sin embargo, dada la baja concentración del retinal en el complejo retinal/CD, no pudieron observarse las señales correspondientes al mismo.

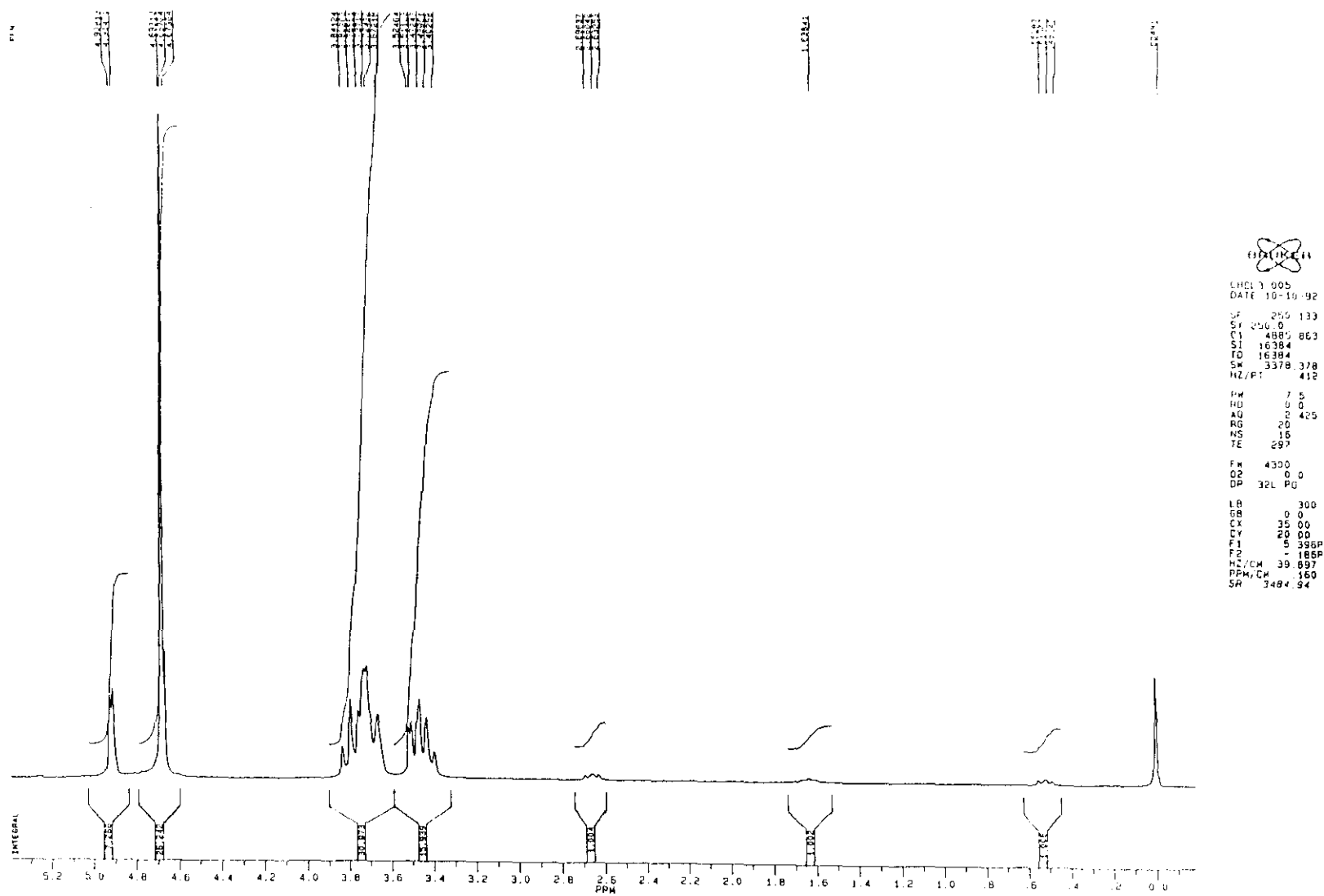


FIGURA 125: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN de β -CD pura en D_2O . δ : desplazamiento químico (ppm).

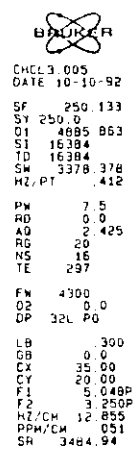
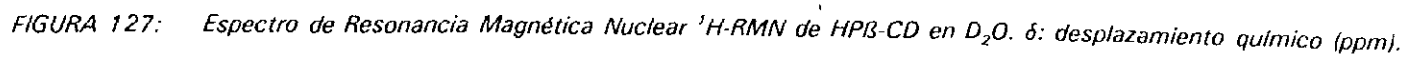


FIGURA 126: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN de β -CD pura en D_2O . Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).



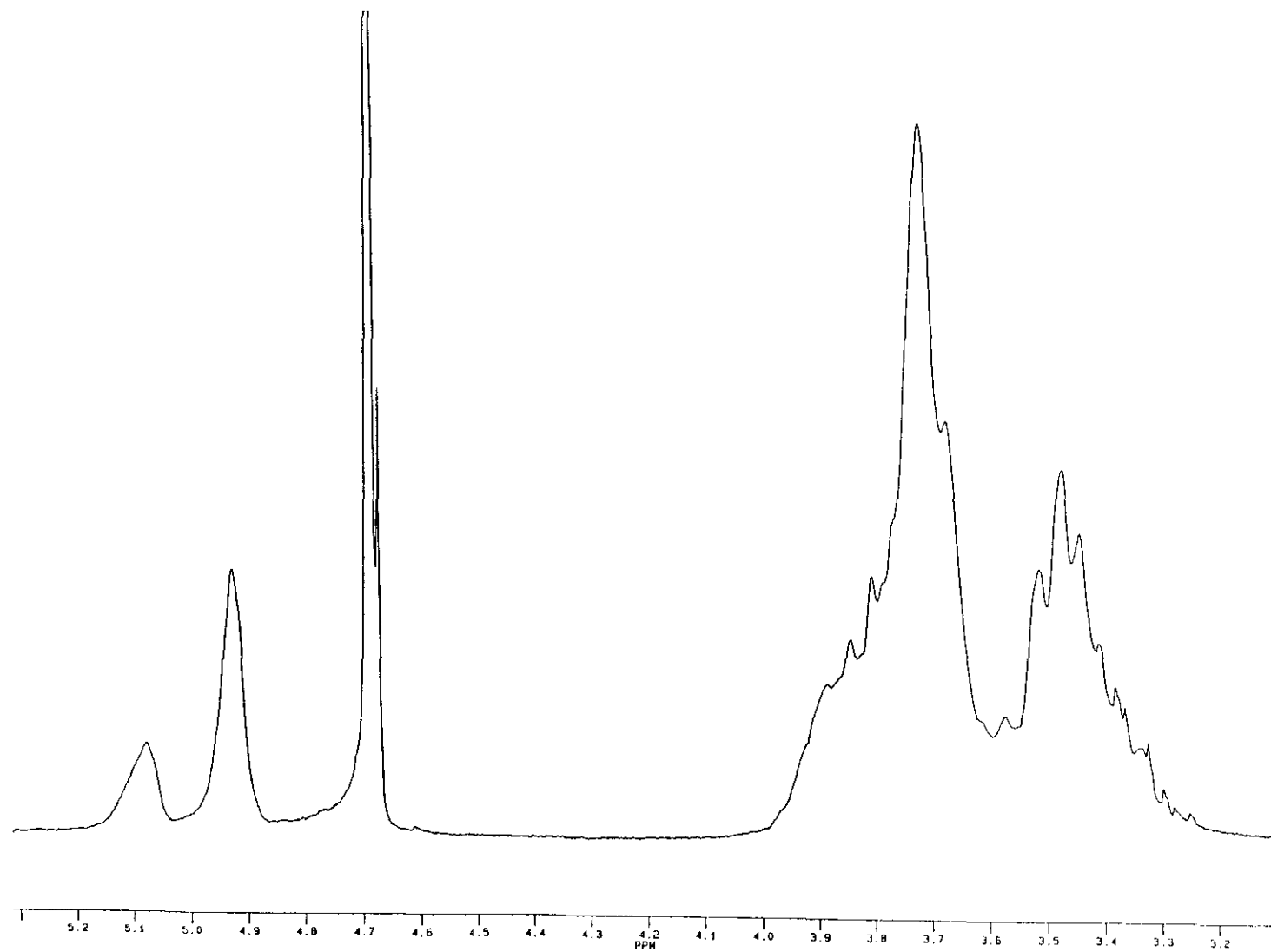


FIGURA 128: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN de HP β -CD pura en D_2O . Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

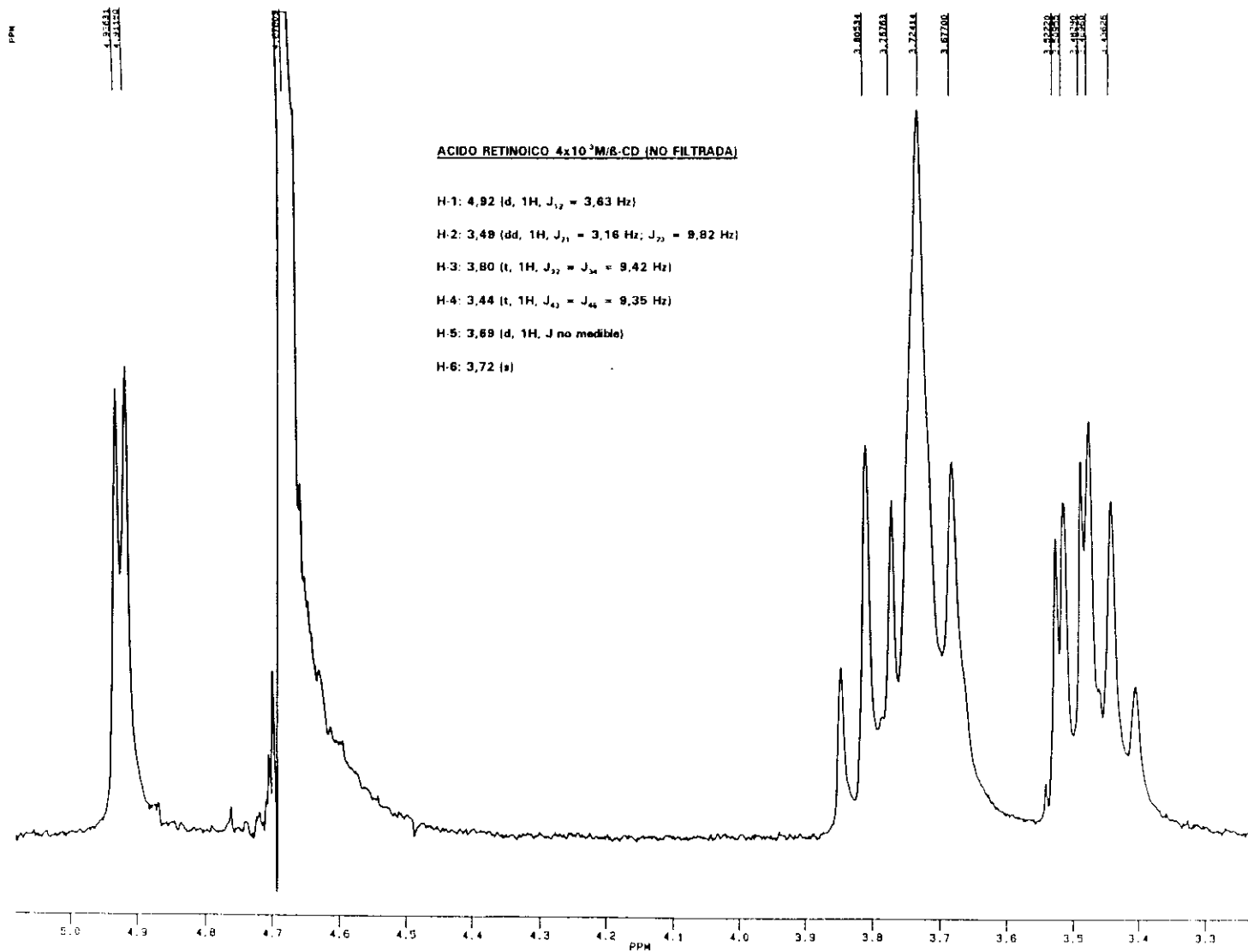


FIGURA 129: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹H-RMN del complejo ácido retinoico/β-CD. δ: desplazamiento químico (ppm).

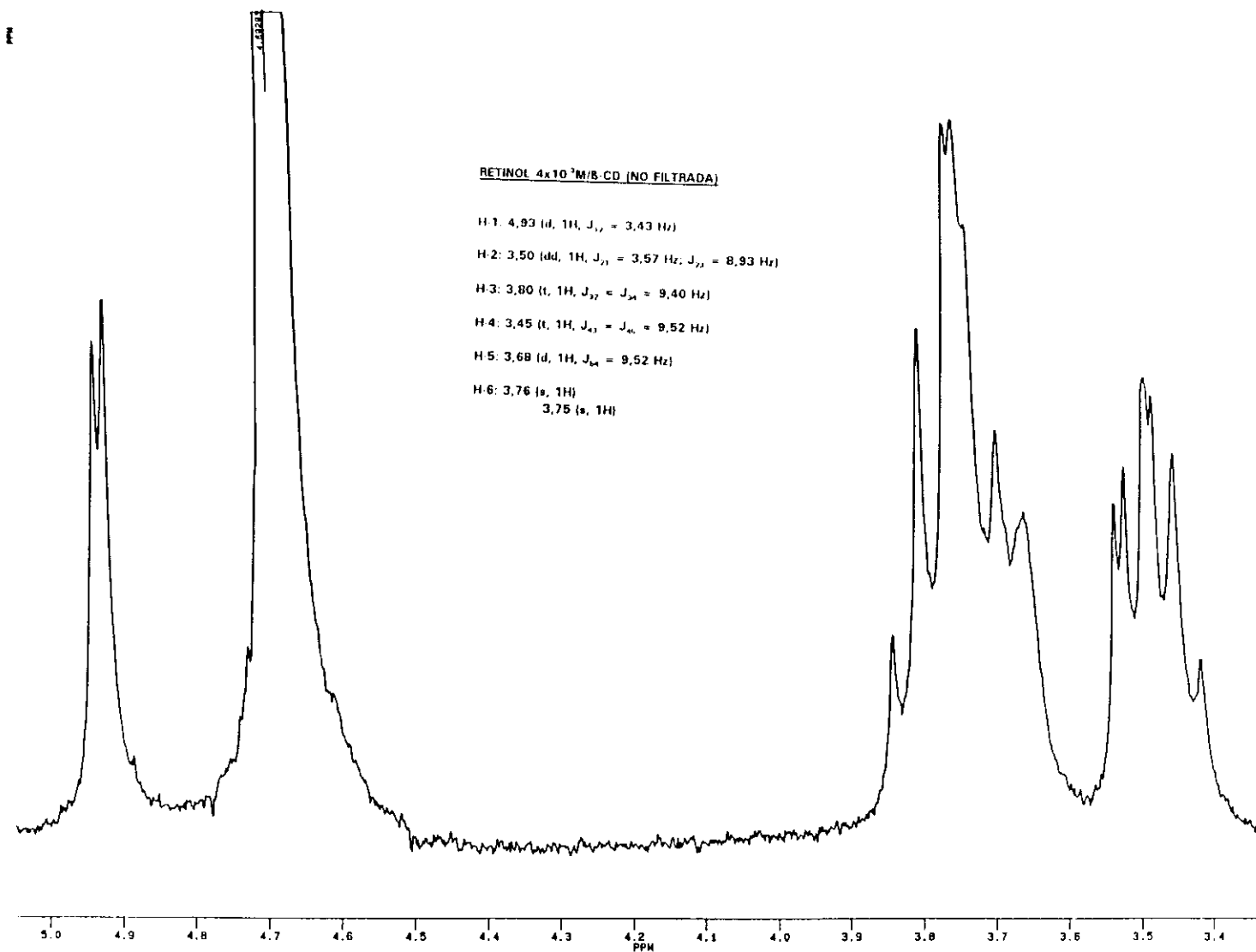


FIGURA 130: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinol/β-CD. δ : desplazamiento químico (ppm).

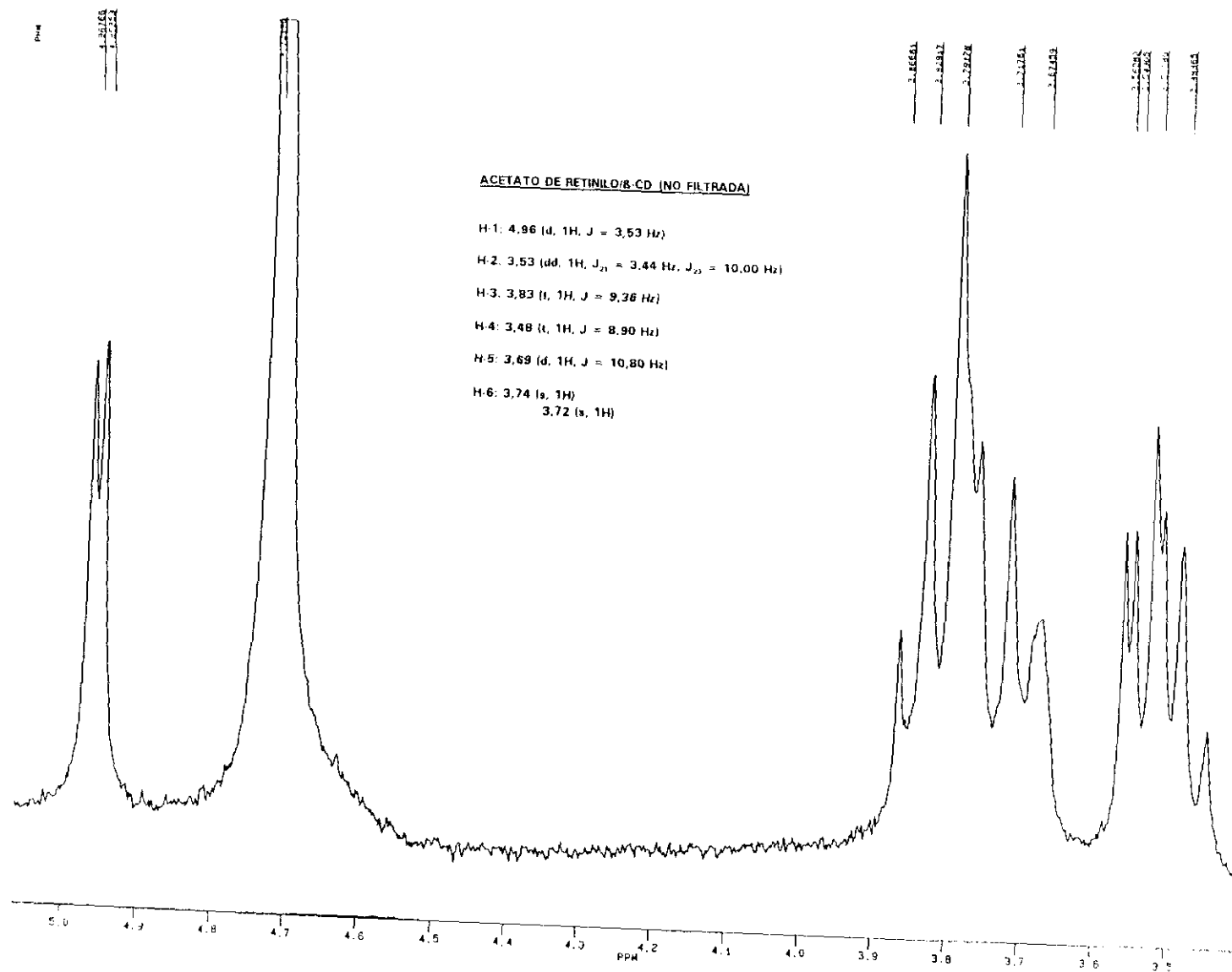


FIGURA 131: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo acetato de retinilo/B-CD. δ : desplazamiento químico (ppm).

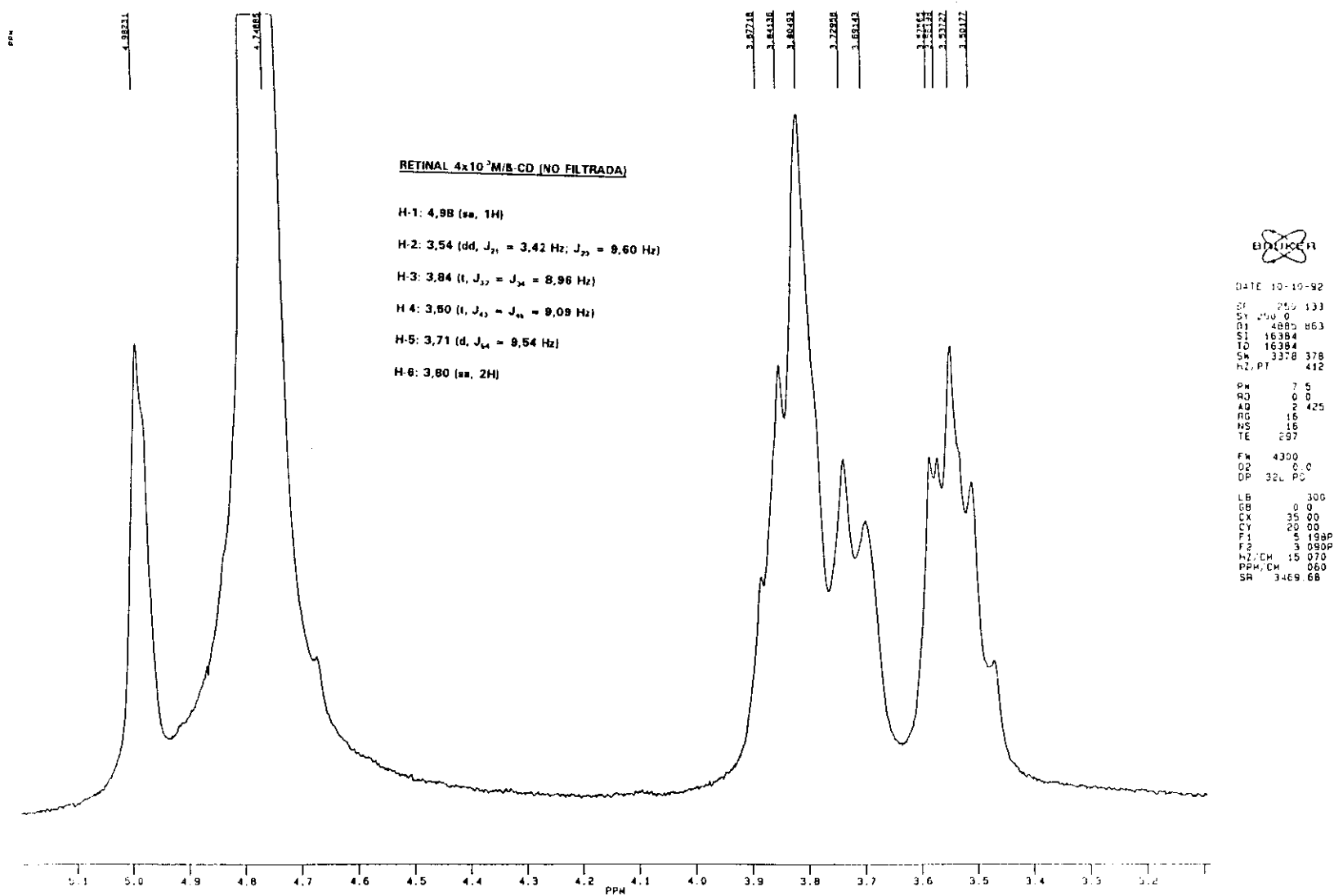


FIGURA 132: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($4 \times 10^{-3} \text{ M}$)/ β -CD (solución no filtrada). Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

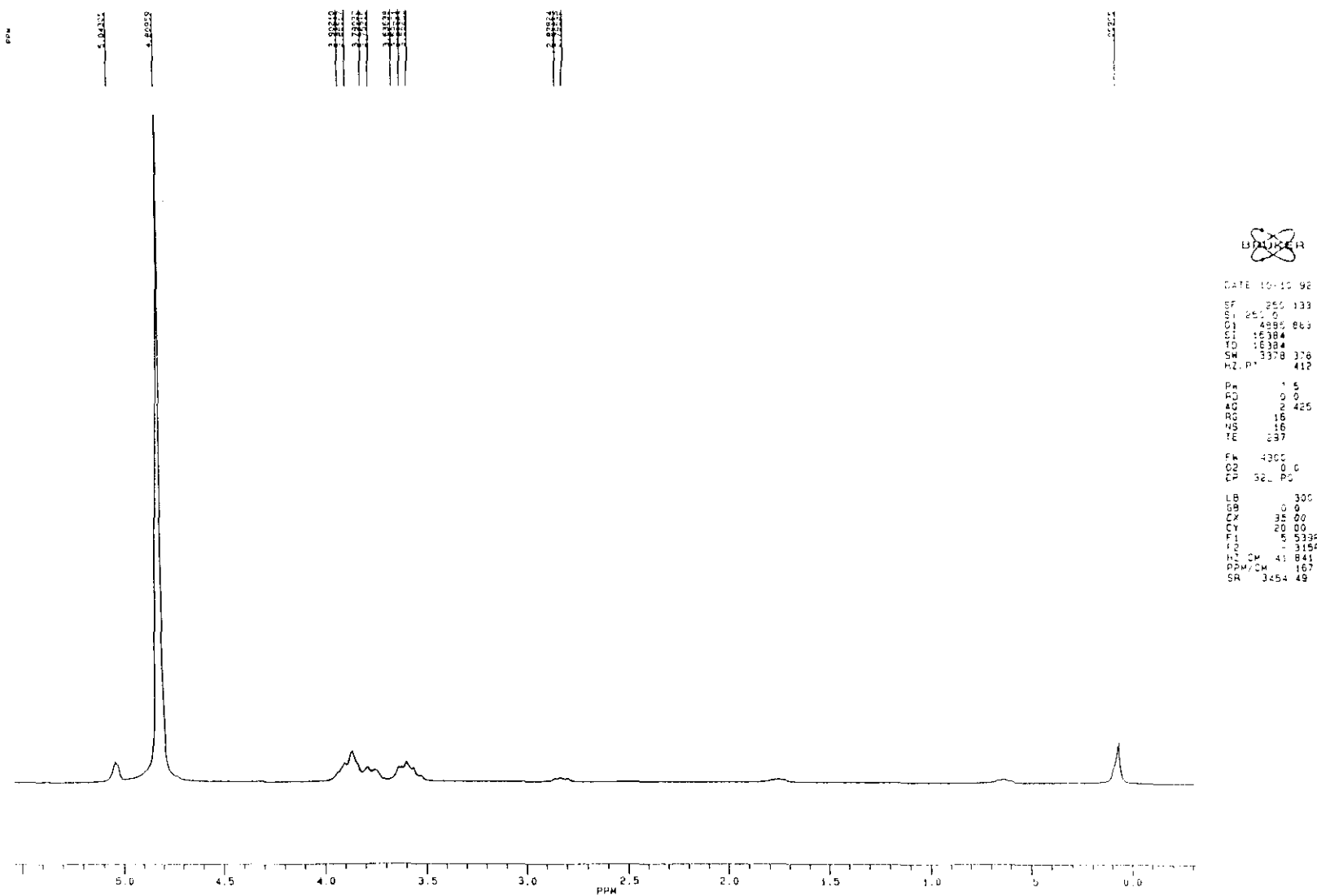


FIGURA 133: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($4 \times 10^{-3} \text{M}$)/ β -CD (solución no filtrada). δ : desplazamiento químico (ppm).

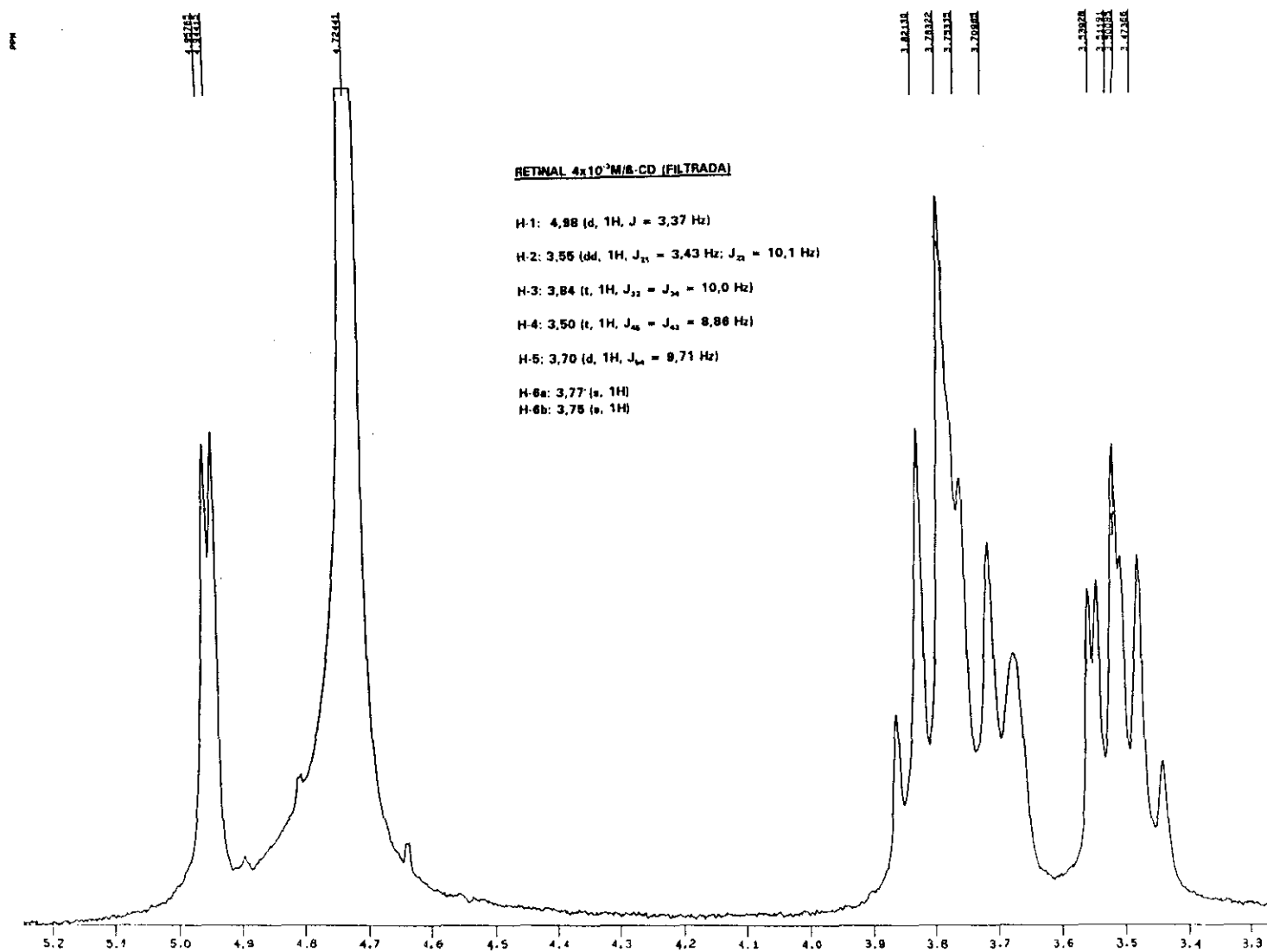
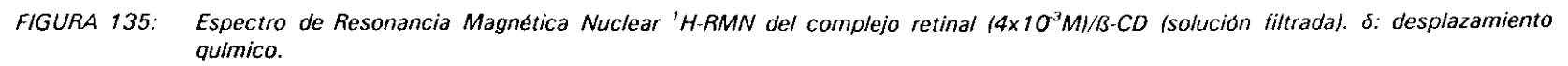


FIGURA 134: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($4 \times 10^{-3} \text{ M}$)/ $\beta\text{-CD}$ (solución filtrada). Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).



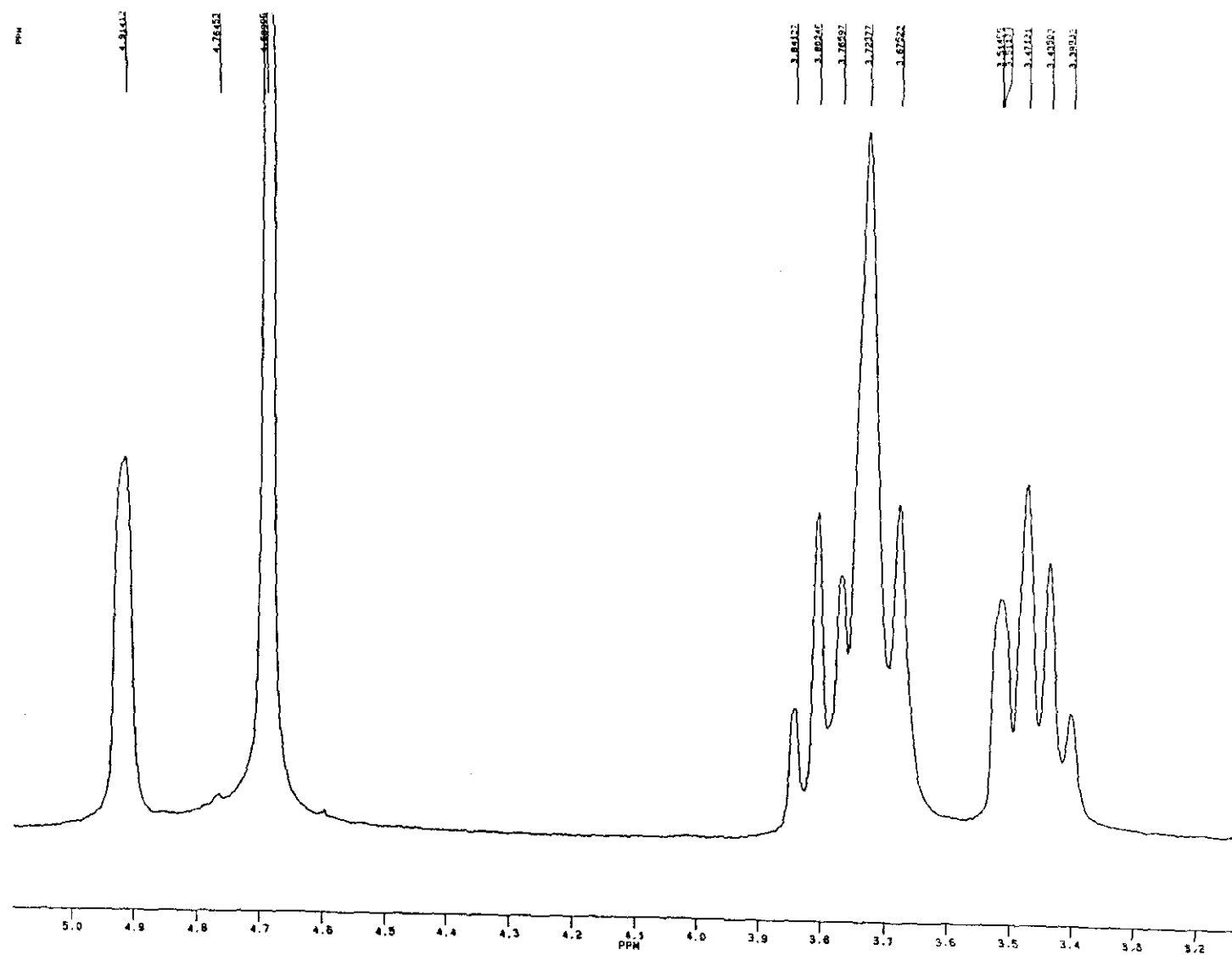


FIGURA 136: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($1 \times 10^{-3}\text{M}$)/B-CD (solución no filtrada). Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

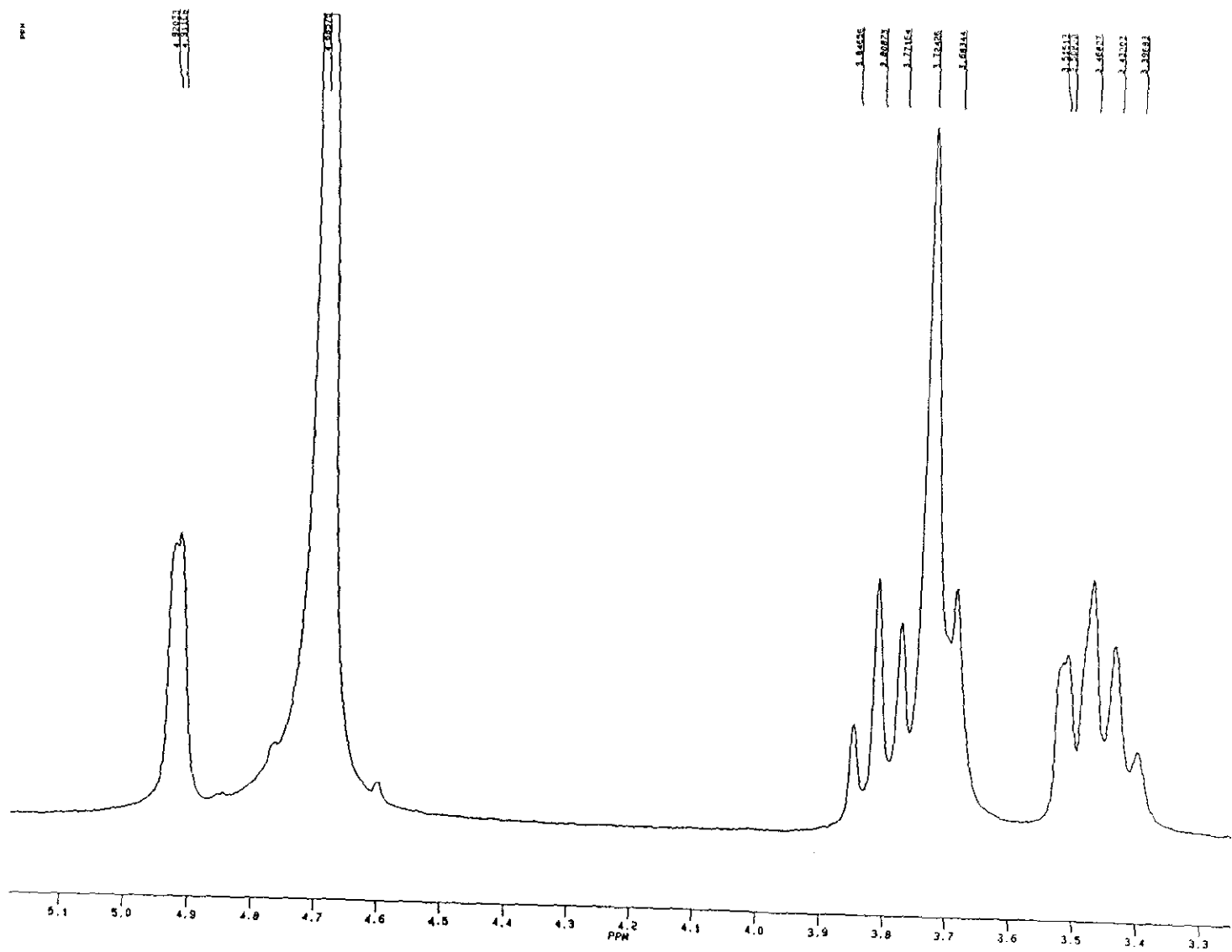


FIGURA 137: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($2 \times 10^{-3}\text{M}$) /B-CD (solución no filtrada). Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

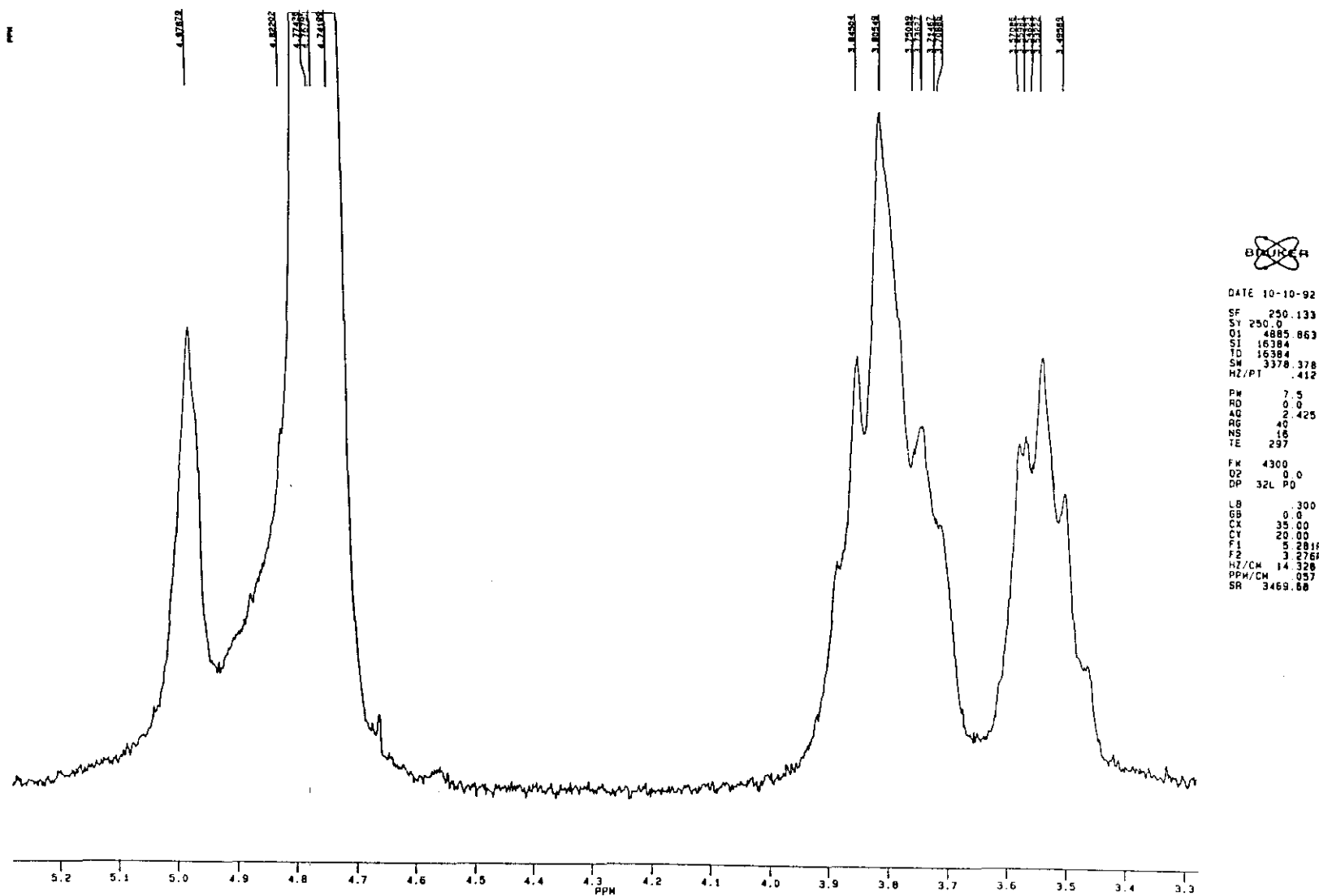


FIGURA 138: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($6 \times 10^{-3} \text{M}$) /B-CD (solución no filtrada). Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

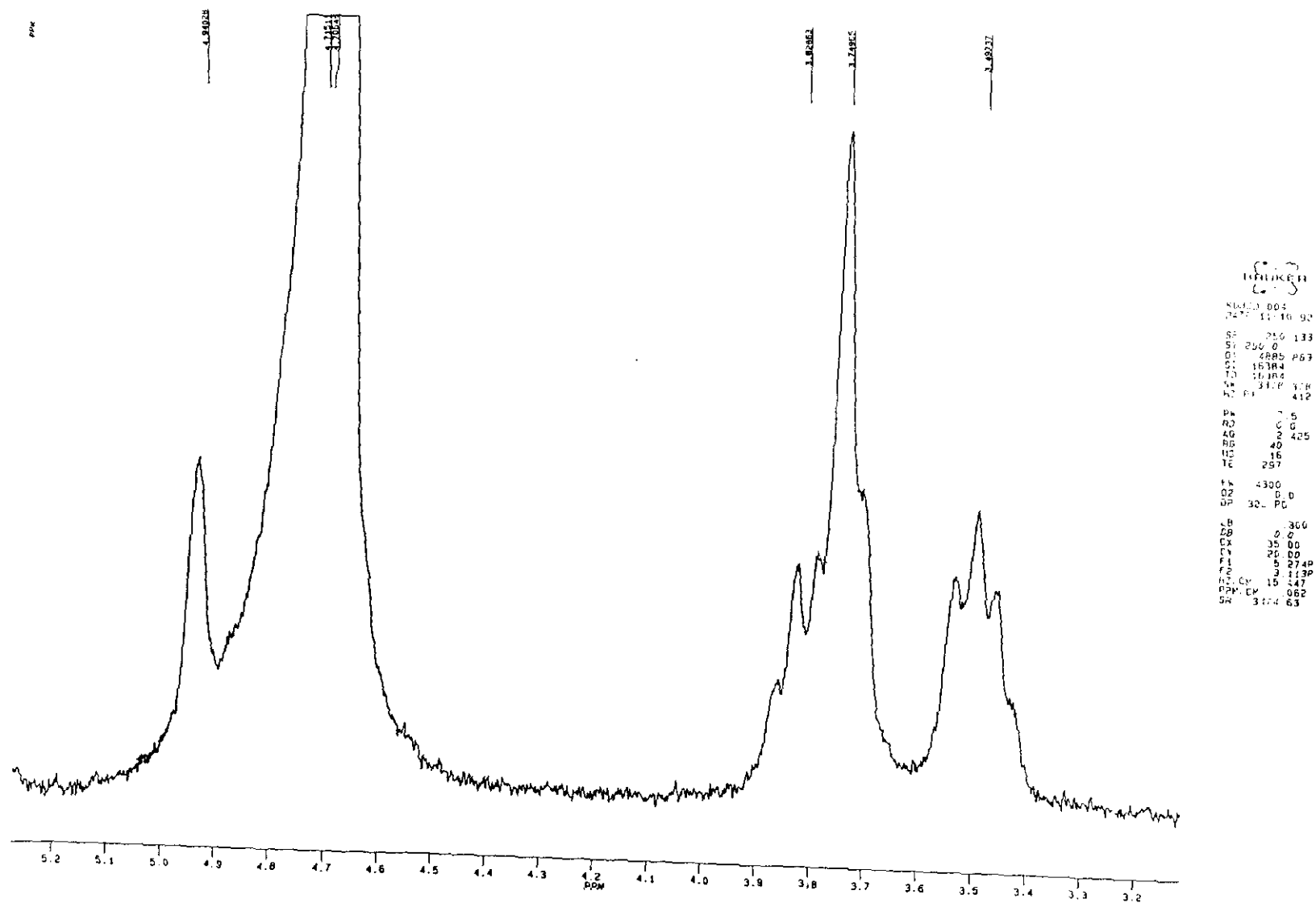


FIGURA 139: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($8 \times 10^{-3}\text{M}$) / β -CD (solución no filtrada). Escala expandida.
 δ : desplazamiento químico (ppm).

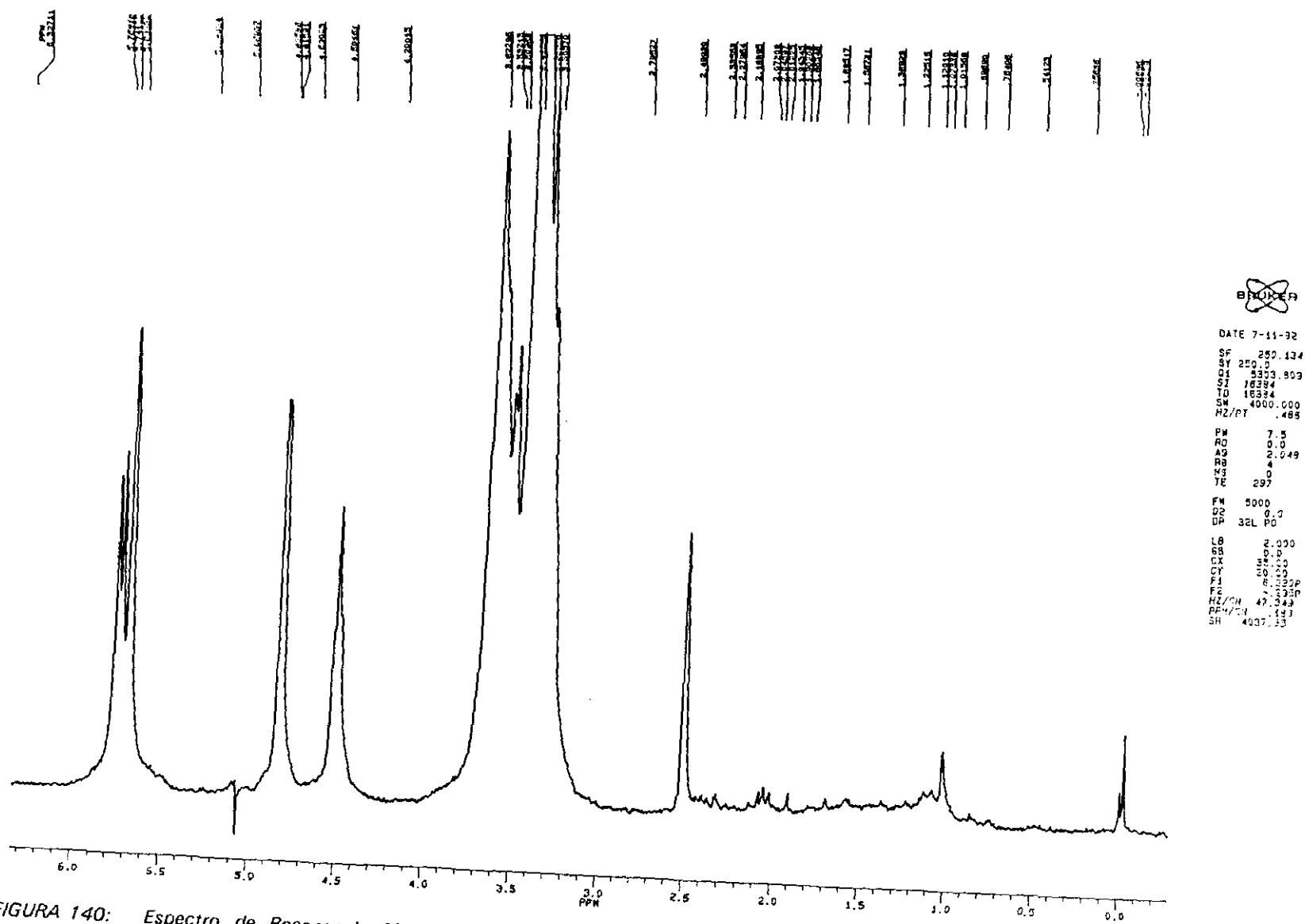


FIGURA 140: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN del complejo retinal ($4 \times 10^{-3}\text{M}$)/ β -CD sólido y disuelto en $\text{DMSO}-d_6$. Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

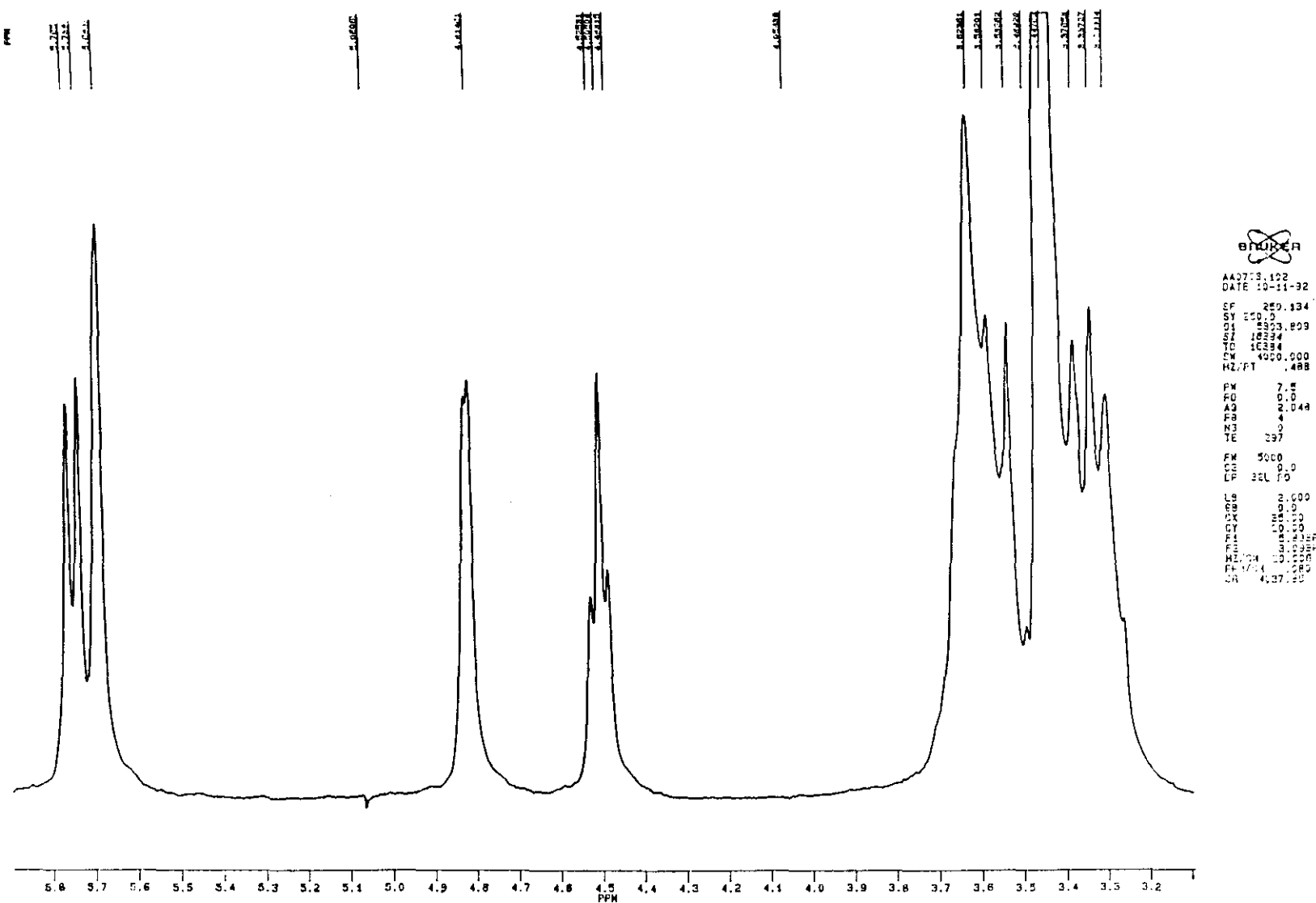


FIGURA 141: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN de β -CD disuelta en $\text{DMSO}-d_6$. Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

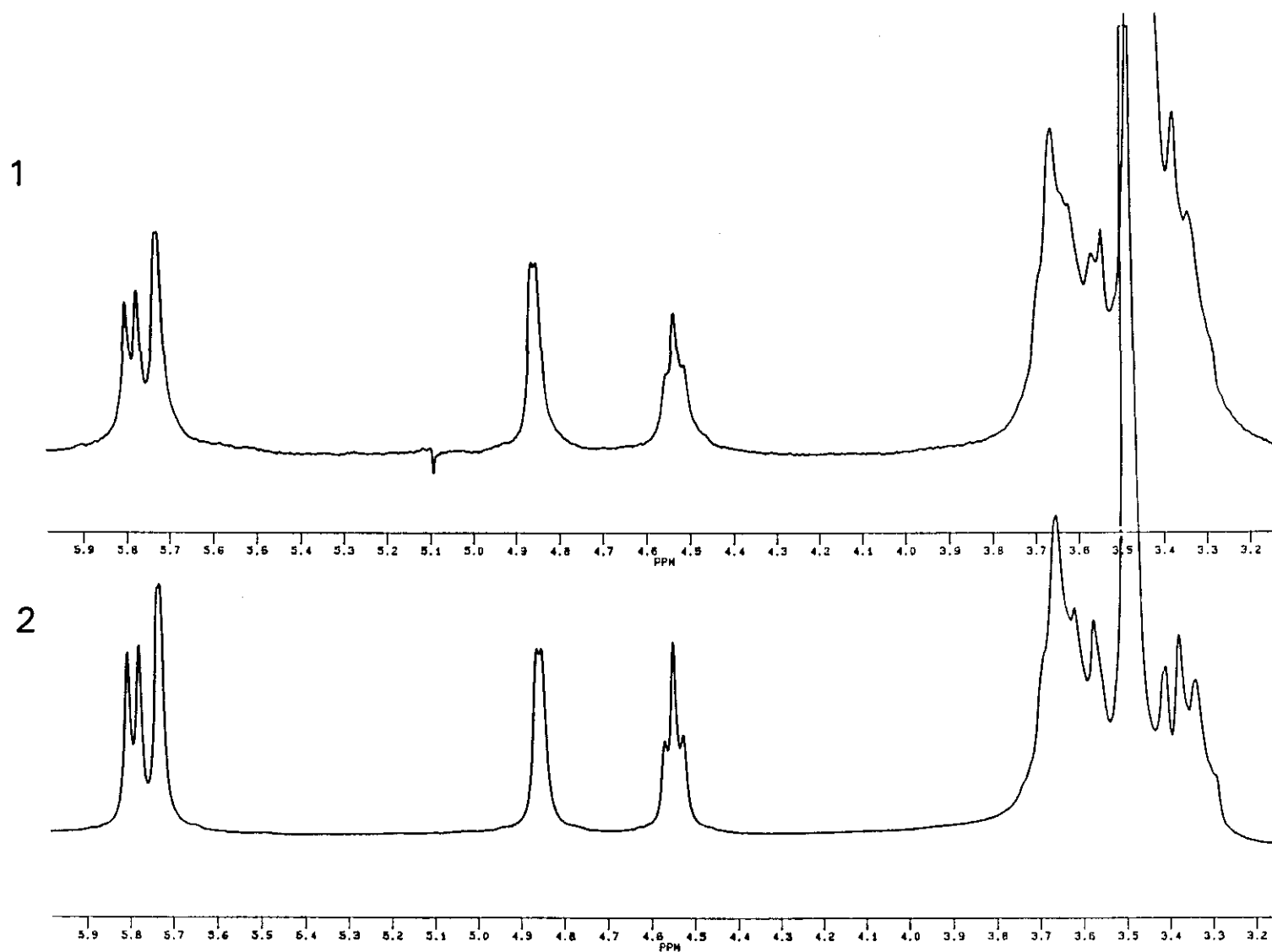


FIGURA 142: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN de: 1) complejo sólido retinal ($4 \times 10^{-3}\text{M}$)/ β -CD, 2) β -CD. Solvente $\text{DMSO}-d_6$. Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

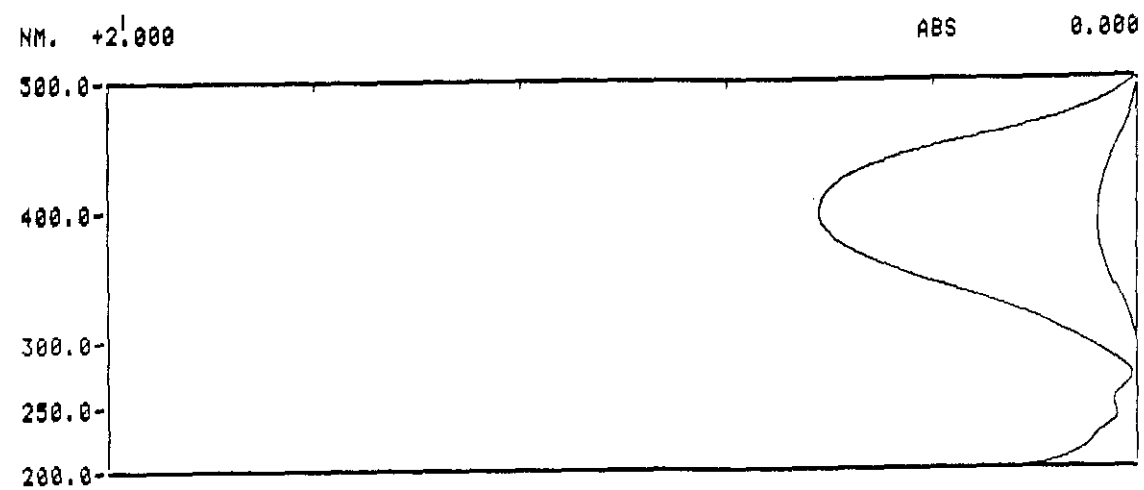


FIGURA 143: Espectro de absorción UV-VIS del complejo aislado retinal/ β -CD tras su obtención en el seno de D_2O (1 mg de complejo sólido disuelto en 10 mL de agua).

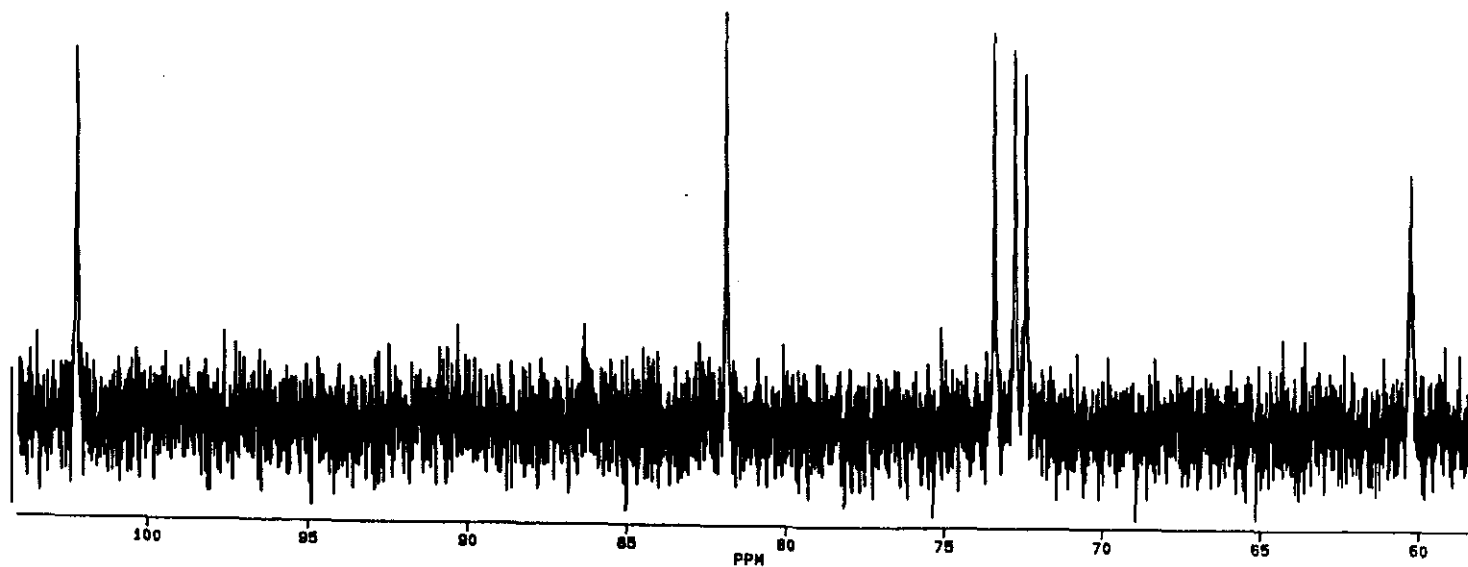


FIGURA 144: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN de β -CD en DMSO-d_6 . Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm).

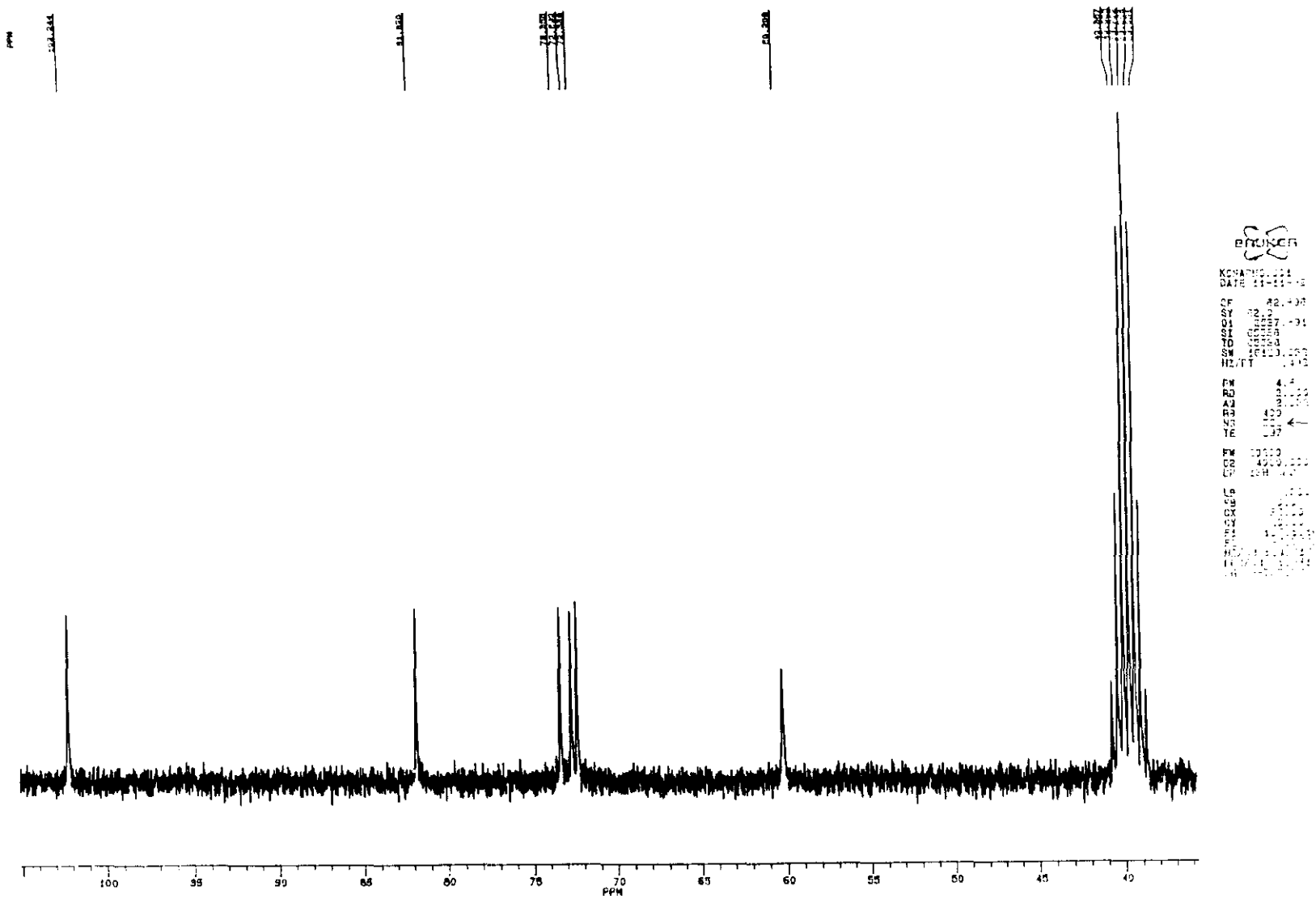


FIGURA 145: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN de β -CD en $\text{DMSO}-d_6$, δ : desplazamiento químico (ppm).

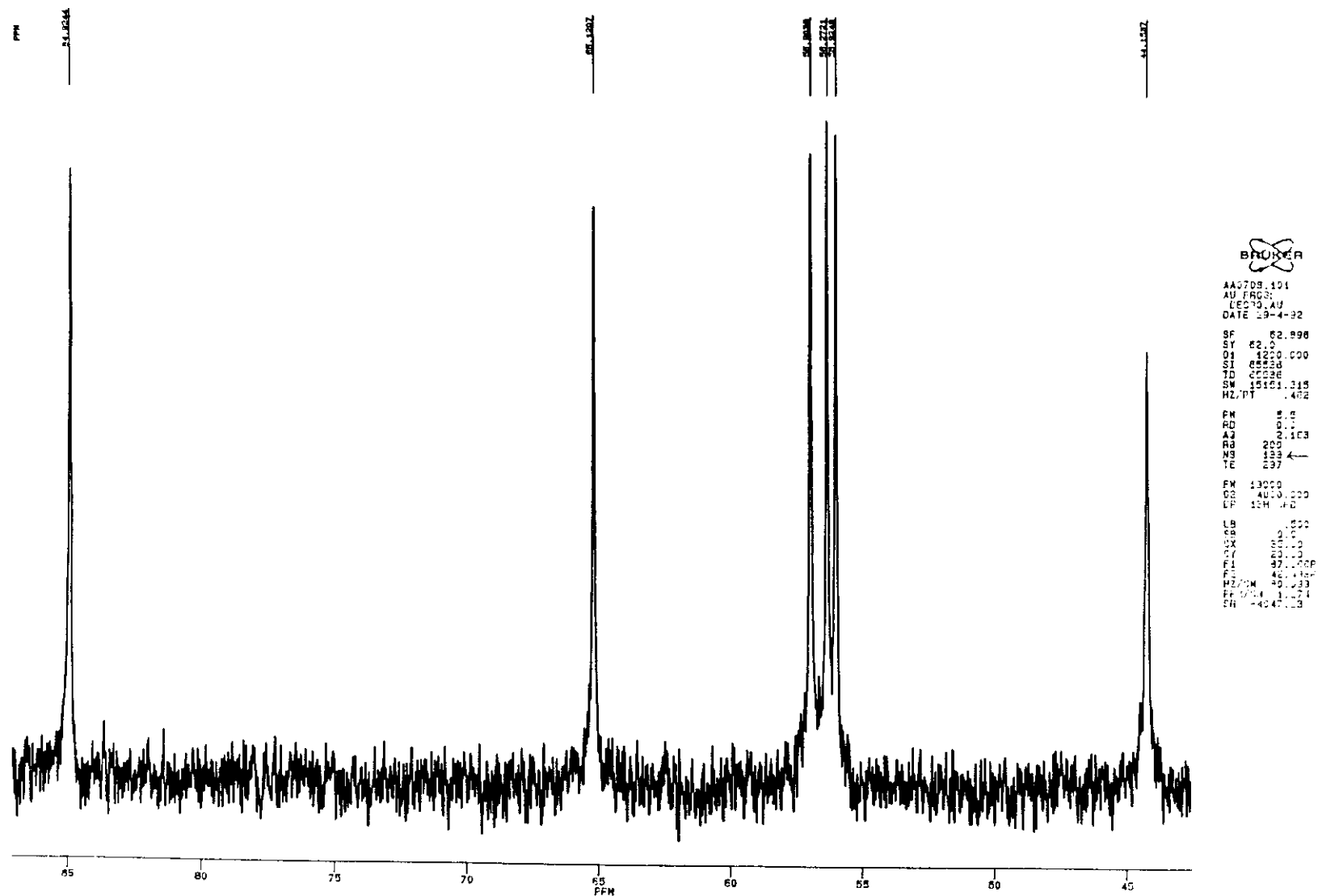
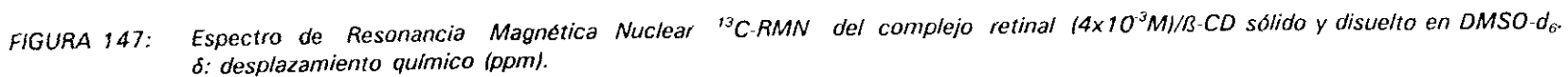


FIGURA 146: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN del complejo retinal ($4 \times 10^{-3}\text{M}$)/B-CD sólido y disuelto en DMSO-d_6 . Escala expandida. δ : desplazamiento químico (ppm). De acuerdo con la señal del patrón interno, hay que sumar a todas las señales $15'2 \text{ ppm}$.



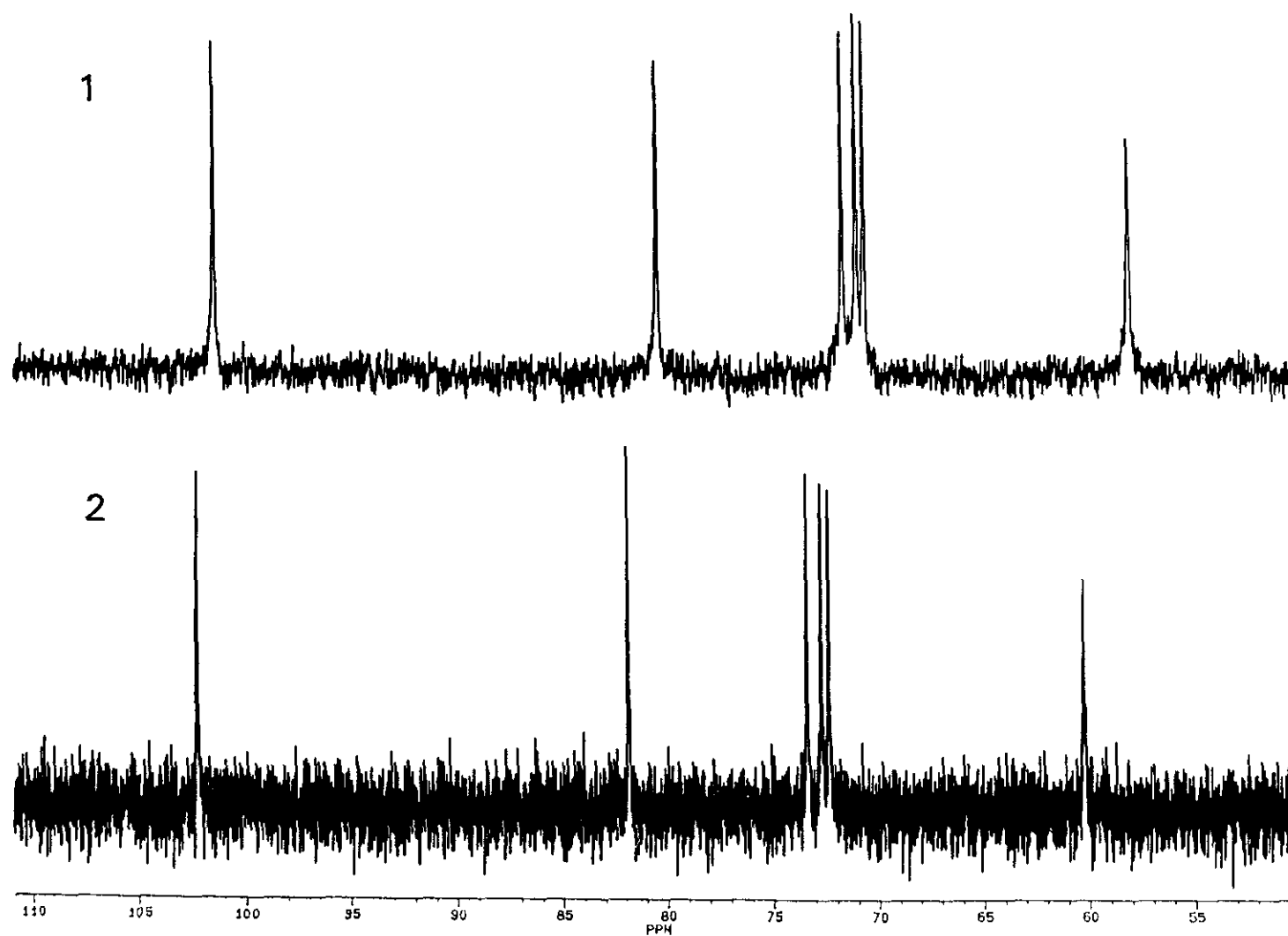


FIGURA 148: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN de: 1) el complejo retinal ($4 \times 10^{-3} \text{M}$)/ β -CD sólido. 2) β -CD. Solvente $\text{DMSO}-d_6$. δ : desplazamiento químico (ppm).

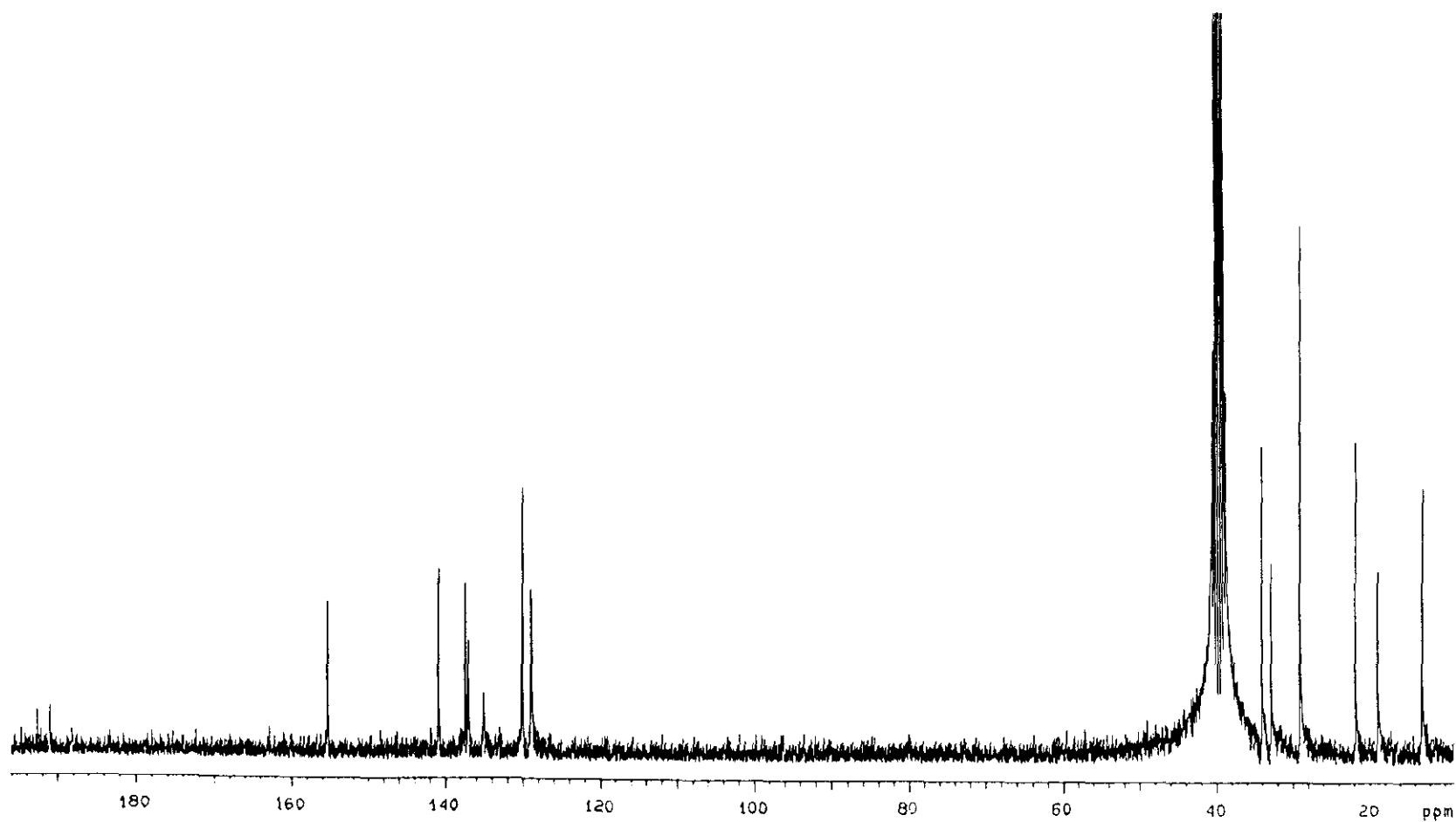


FIGURA 149: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN del todo-trans retinal disuelto en DMSO-d_6 . δ : desplazamiento químico (ppm).

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
β -CD	4'92	3'49	3'80	3'44	3'69	3'74 y 3'72
retinal/ β -CD (filtrada)	4'98	3'55	3'84	3'50	3'70	3'77 y 3'75
retinal/ β -CD	4'98	3'54	3'84	3'50	3'71	3'80
ácido retinoico/ β -CD	4'92	3'49	3'80	3'44	3'69	3'72
retinol/ β -CD	4'93	3'50	3'80	3'45	3'68	3'75
acetato de retinilo/ β -CD	4'96	3'53	3'83	3'48	3'69	3'79

TABLA V: Valores de desplazamiento químico δ (ppm) para los complejos obtenidos en agua deuterada. Datos correspondientes a los espectros de ^1H -RMN.

	H-1	H-2 J ₂₁ J ₂₃		H-3	H-4
β-CD	3'35	3'35	9'69	9'60	9'26
retinal/β-CD	*	3'42	9'60	8'96	9'09
retinal/β-CD (filtrada)	3'37	3'43	10'10	10'00	8'26
ácido retinoico/β-CD	3'63	3'16	9'82	9'42	9'35
retinol/β-CD	3'43	3'57	8'93	9'40	9'52
acetato de retinilo/β-CD	3'53	3'44	10'00	9'36	8'90

TABLA VI: Valores de constante de acoplamiento (J en Hz), para los complejos obtenidos por el procedimiento habitual disueltos en agua deuterada (¹H-RMN), * J no medible, ** los valores de J de los protones H-5 y H-6 no pudieron medirse.

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	CH-OH	CH-OH	CH ₂ OH
β-CD	5'75	3'36	ND*	3'30	3'56	3'62	5'69	4'81	4'51
retinal/β-CD	5'75	ND**	ND*	3'30	3'52	3'62	5'69	4'82	4'50

TABLA VII: Valores de desplazamiento químico δ (ppm) para la β-CD y el complejo aislado (retinal/β-CD) disueltos en DMSO deuterado. Datos correspondientes a los espectros ¹H RMN, * superpuesto con H-6, ** parcialmente superpuesto con la señal del agua.

	β -CD*	retinal/ β -CD	$\Delta\delta(\text{ppm})$
C-1	102'24	100'12	- 2'12
C-2	72'34	71'12	- 1'22
C-3	72'69	71'47	- 1'22
C-4	81'82	80'32	- 1'50
C-5	73'36	72'10	- 1'26
C-6	60'21	59'36	- 0'85

TABLA VIII: Valores de desplazamiento químico δ (ppm) para la β -CD y el complejo aislado retinal/ β -CD disueltos en DMSO deuterado. Datos correspondientes a los espectros de ^{13}C -RMN, * esta asignación coincide con la mencionada en : P. Colson, H.J. Jennings, I.C.P. Smith, J. Am. Chem. Soc, **96**, 8081 (1974).

III.B.1.3 ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION INFRARROJA

Se procedió de acuerdo a como se describe en la bibliografía [1969 DS 119] para la obtención de los espectros de absorción IR del retinal puro (FIGURA 150), del complejo aislado retinal/ β -CD (FIGURA 151) y de la mezcla física retinal/ β -CD (FIGURA 152) según lo expresado en la metodología (Apartado III.A.2.2).

Si se comparan los espectros IR del retinal y del complejo, se observa que existe una notable pérdida de resolución en toda la región espectral considerada para el caso del complejo. La mezcla física retinal/ β -CD muestra un comportamiento intermedio con respecto a los dos anteriores. Se aprecia una pérdida de resolución con respecto al retinal puro, pero la mayoría de las bandas de absorción características del retinal se hacen bien patentes. Unicamente las regiones comprendidas entre los 1000 cm^{-1} y los 1200 cm^{-1} y los 3000 y los 3500 cm^{-1} cambian notablemente debido a la presencia de la ciclodextrina. La alteración de estas bandas de absorción indica la formación del complejo de inclusión, aunque también podría deberse a la adsorción del retinal en la superficie de una molécula de ciclodextrina o entre dos moléculas de CD (FIGURA 153), especialmente si tenemos en cuenta el desplazamiento en la banda de absorción del $\text{C}=\text{O}$ carbonílico, tratándose de un carbonilo conjugado y a la vista de los resultados obtenidos por otras técnicas instrumentales.

Los espectros IR de la mezcla física y del retinal presentan un perfil de absorción muy semejante. La pérdida de resolución puede explicarse como un "efecto de concentración" debido a la presencia de la CD, que puede modificar el perfil y la intensidad de las bandas. Sin embargo, si se comparan los espectros de absorción IR del retinal y del complejo retinal/ β -CD, se observa un ensanchamiento significativo en la banda de absorción del carbonilo. Podemos por tanto decir que el "enmascaramiento" de las bandas de absorción del retinal se debe a la formación del complejo de inclusión y no únicamente a un efecto de concentración debido a la presencia de la ciclodextrina.

Si tenemos presente el espectro de absorción IR de la β -CD (FIGURA 154) se puede observar que éste guarda una gran similitud con el del complejo. Esto es debido a que la

concentración de ciclodextrina en el complejo es elevada y solapa las bandas de absorción del retinal. Sin embargo, la banda de absorción IR correspondiente al carbonilo, y característica del retinal, se deforma y modifica pero no desaparece, solo se desplaza.

Hemos de tener en cuenta que en la mezcla física el solapamiento no es tan evidente, probablemente debido a que la concentración de ciclodextrina es menor que en el complejo. Consecuentemente en el momento de preparar la mezcla física, supusimos que se produce la formación de un complejo 1:1 (retinal/ β -CD), por lo que la proporción en peso de β -CD corresponde a la que hemos supuesto. Sin embargo, el espectro IR del compuesto de inclusión demuestra que la concentración de ciclodextrina es mayor, lo cual a nuestro entender puede explicarse de dos maneras: bien porque a la vista de los datos de la estequiometría, ésta no sea 1:1, o bien porque en la obtención del complejo sólido, parte de las moléculas de ciclodextrina que no incluyen al retinal hubieran precipitado junto con el complejo.

Aunque la espectroscopia IR no es la técnica idónea para el estudio de este tipo de complejos, debido a que las modificaciones espectrales quedan ocultas por la presencia mayoritaria de moléculas de ciclodextrina, algunos autores se basan en las pequeñas alteraciones observadas en el espectro IR del complejo, para proponer la existencia del complejo de inclusión para β -CD y antiinflamatorios (indometacina o ácido flufenámico), donde la banda del carbonilo se desplaza a frecuencias más bajas o desaparece debido al ensanchamiento de la banda.

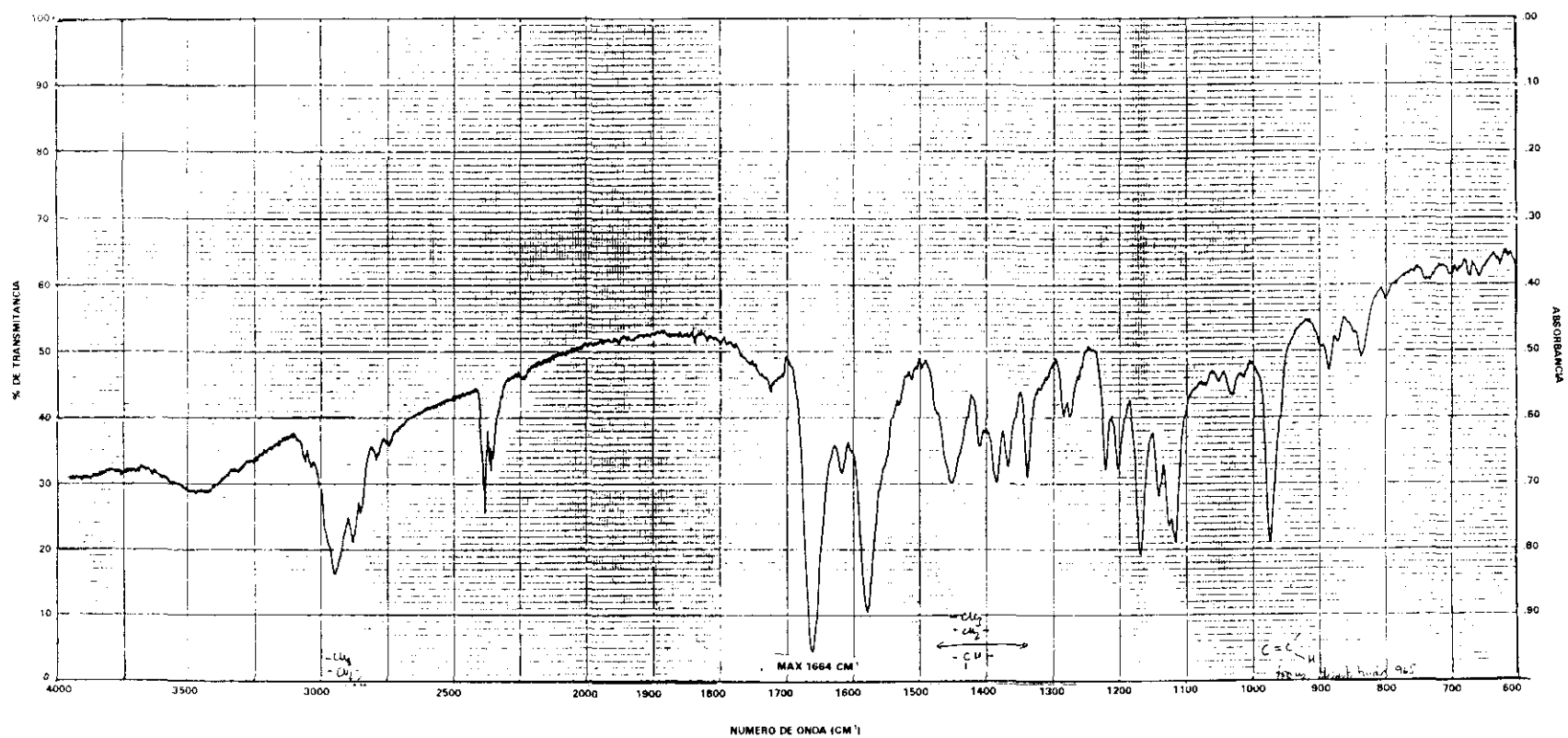


FIGURA 150: Espectro de absorción IR del todo-trans retinal.

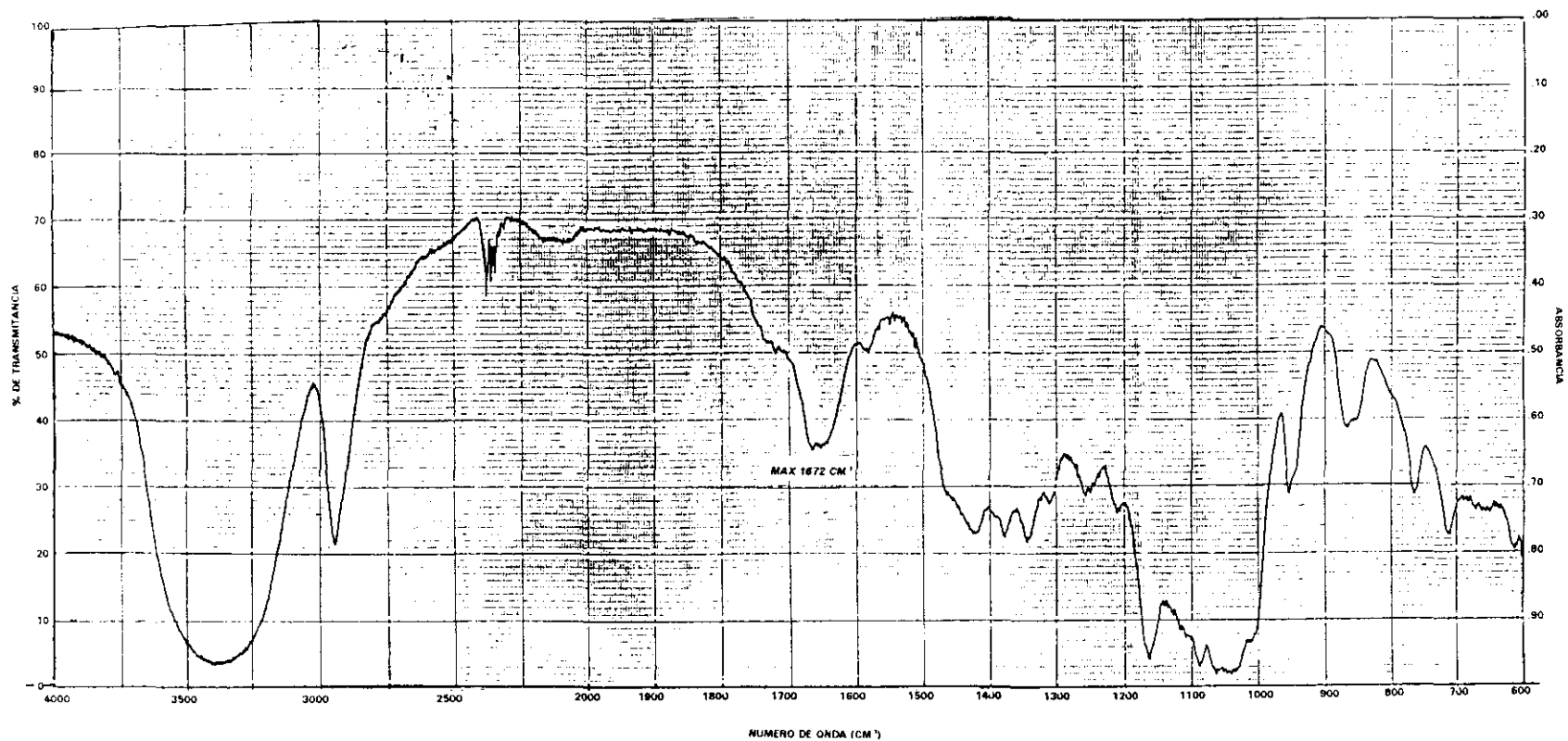


FIGURA 151: Espectro de absorción IR del complejo aislado retinal/B-CD.

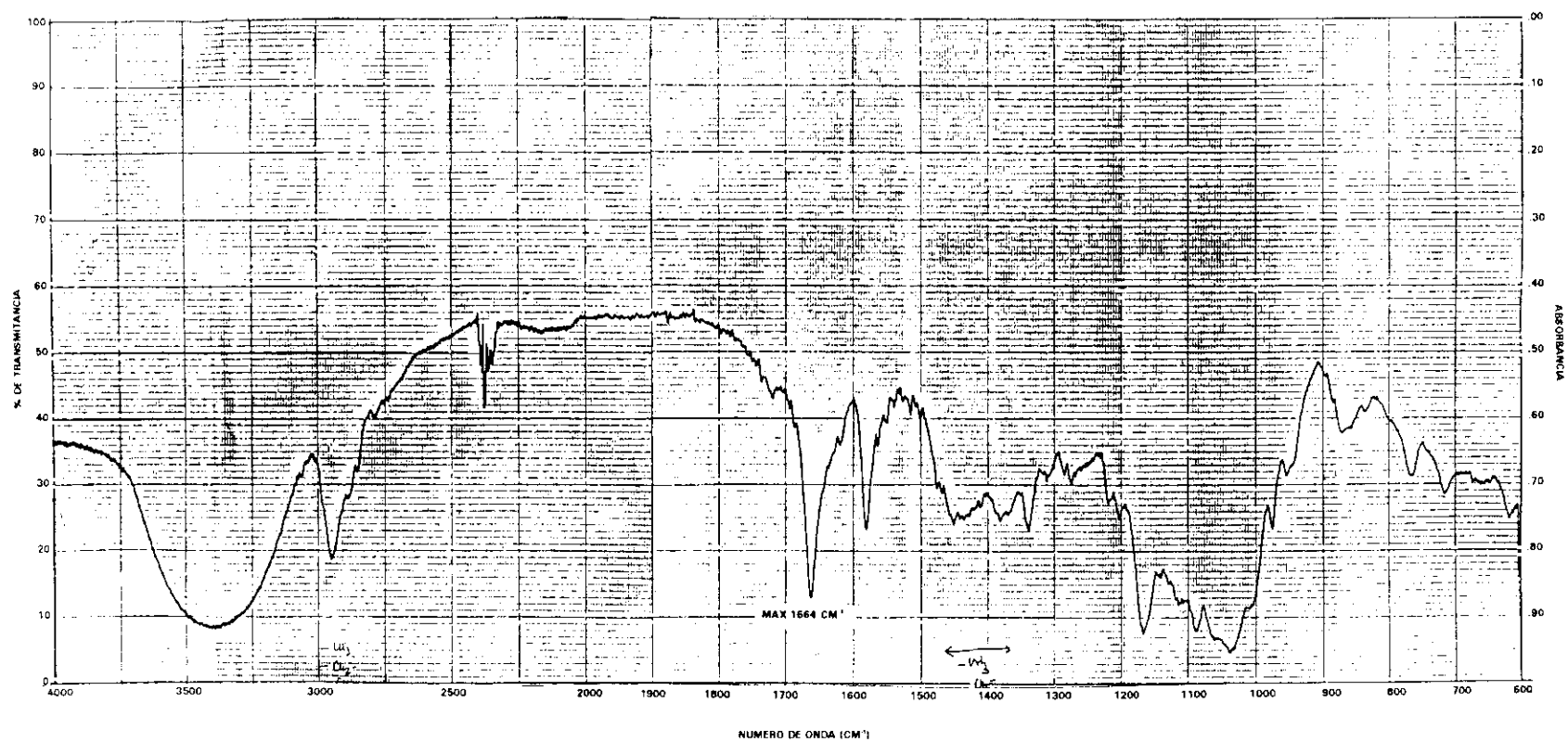


FIGURA 152: Espectro de absorción IR de la mezcla física retinal/ β -CD.

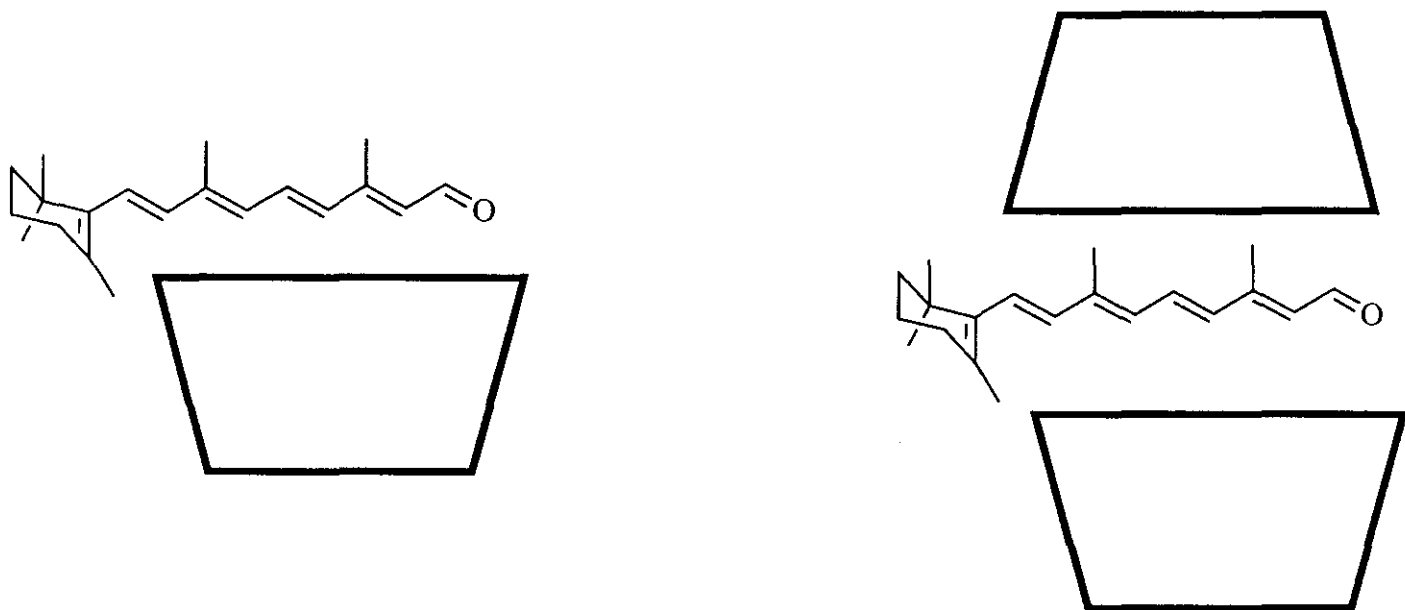


FIGURA 153: Modos de interacción propuestos para la mezcla física retinal/ β -CD.

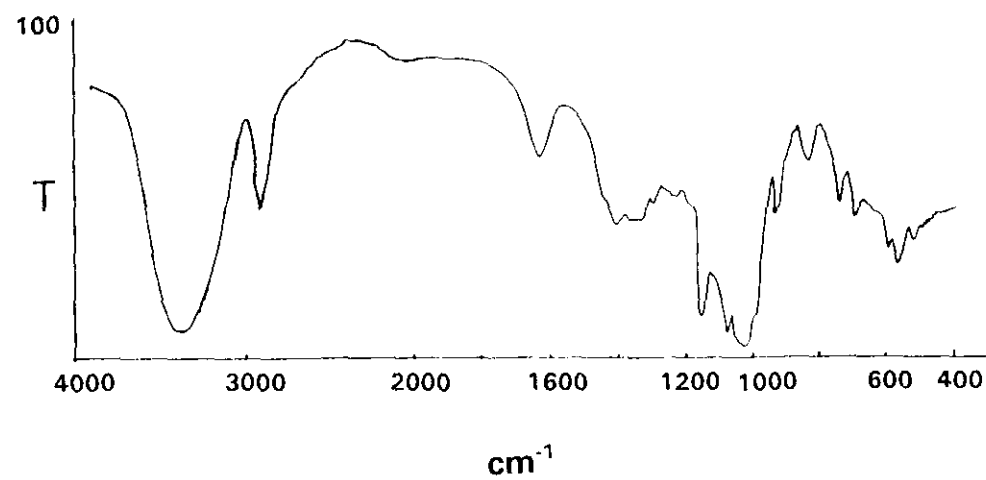


FIGURA 154: Espectro de absorción IR de la β -CD.

En las FIGURAS 155 y 156 se presentan las curvas obtenidas en el estudio por termogravimetría (TG) y termogravimetría diferencial (DTG) tanto del complejo retinal/ β -CD como de la mezcla física, así como la curva de termogravimetría de la ciclodextrina pura (FIGURA 157).

En el caso de la mezcla física se aprecia una primera pérdida de peso inicial con un máximo situado a 40°C (como se observa en la curva de DTG) y cuyo valor es de aproximadamente un 3%, que podría atribuirse al retinal. Se aprecia un segundo pico situado a 72°C, con una pérdida de peso ligeramente superior al 12%, atribuible a la pérdida de humedad de la ciclodextrina y que según la bibliografía [1989 L LVII] suele producirse en torno a 100°C, cuyo valor es de aproximadamente un 14%. En la FIGURA 158, correspondiente a distintos métodos térmicos empleados para la β -C, se muestra que en el estudio por DTG, el máximo debido a la pérdida de agua aparece a 70°C. Paralelamente y en concordancia con los datos de la bibliografía, la descomposición de la molécula de ciclodextrina comienza en torno a los 250°C, para producirse la fusión en un punto próximo a los 300°C, que en nuestro caso y según el pico que muestra la derivada (DTG), aparece a 283°C.

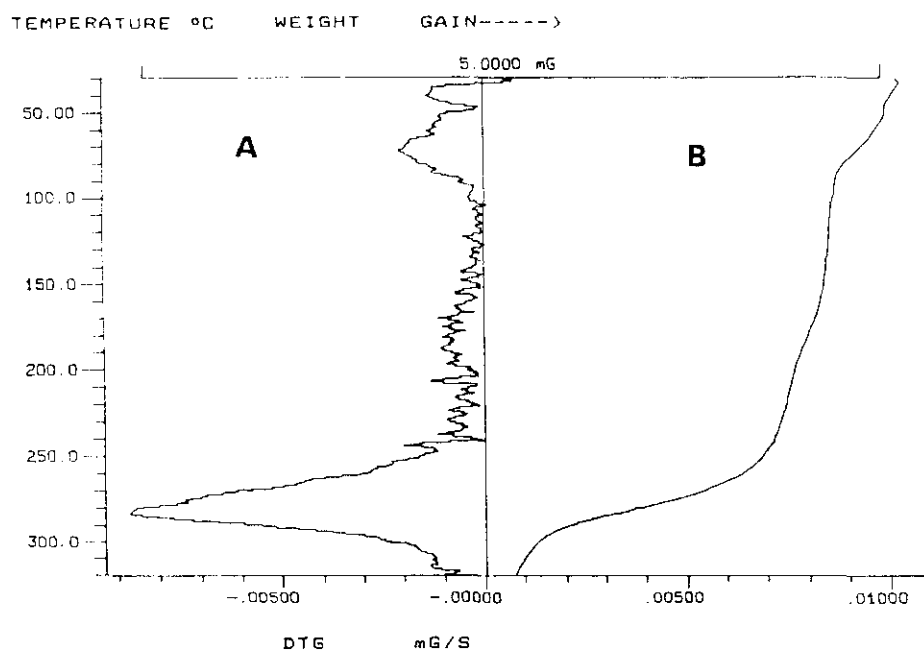
Si estudiamos detenidamente las curvas de TG y DTG, para el complejo de inclusión, observamos que se produce una pérdida de peso de forma continua, pero no se aprecian pérdidas significativas salvo la que se produce como consecuencia de la descomposición de la ciclodextrina, que se inicia en torno a los 230°C. Hemos de señalar que en este caso, la curva presenta mayor ruido debido a que la cantidad de complejo de que se dispuso era muy pequeña.

Si se comparan todas estas curvas, se puede afirmar que los resultados obtenidos en el estudio por termogravimetría confirman la formación del complejo de inclusión, debido a que en el complejo no se observa claramente la pérdida de peso del retinal, sino que dicha pérdida, junto con la de la posible humedad de la ciclodextrina, se produce de forma continua y a temperatura más elevada, lo que implica una protección del retinal en el complejo de inclusión. La citada formación del complejo de inclusión reduce, al menos parcialmente, la volatilidad de los sustratos incluidos, como se ha demostrado en el caso

de los derivados de ácido cinámico [1979 CPB 76]. Según el tipo de sustitución del ácido cinámico y tras la formación del complejo de inclusión con ciclodextrina, el estudio por termogravimetría permite apreciar las variaciones en la volatilidad de estos ácidos.

Por otra parte, hemos de considerar que en el caso del complejo de inclusión, es posible que no se observe de forma clara la pérdida de humedad en el estudio por TG, ya que el complejo se liofilizó previamente y por tanto podría haberse eliminado la humedad, si no en su totalidad al menos parcialmente.

Asimismo, si se comparan las curvas de termogravimetría para el complejo y la mezcla física, se puede apreciar que la pérdida de peso para la temperatura correspondiente a la descomposición de la β -CD es mayor en el caso del complejo ($\approx 79\%$) que en la mezcla física ($\approx 60\%$). Dado que la mezcla física fue preparada considerando que el complejo de inclusión retinal/ β -CD era del tipo 1:1, esta pérdida de peso, mayor en el caso del complejo, confirma lo ya observado por espectrofotometría de absorción IR con respecto al hecho de que la cantidad de β -CD en el complejo es mayor de lo supuesto, ya sea debido a las consideraciones estequiométricas, ya sea debido al hecho de que las moléculas de ciclodextrina libre y cristalizada acompañan al complejo de inclusión.



19-JUL-92 17:11

19-JUL-92 13:05 **

STEP ANALYSIS

DYN/ISO 1/2

AUTOLIMIT 0/1

START

END

BASELINE TYPE

PLQT MODE CM

PLQT MODE 2031

MOL MASS GAS

MOL MASS INIT.

IDENT. NO.

RATE K/MIN.

WEIGHT mG

1

1

30

320

1

11

2031

0

0

2

10

2.9830

STEP

START TEMP. °C

PEAK TEMP. °C

END TEMP. °C

Δm mG

Δm %/a

33.0

39.5

47.0

-0.08900

-2.9836

STEP

START TEMP. °C

PEAK TEMP. °C

END TEMP. °C

Δm mG

Δm %/a

47.0

72.0

103.0

-0.37100

-12.437

Δm mG

Δm %/a

-0.01000

-0.33524

Δm mG

Δm %/a

-0.01700

-0.56989

STEP

START TEMP. °C

PEAK TEMP. °C

END TEMP. °C

Δm mG

Δm %/a

166.0

169.5

203.0

-0.16000

-5.3637

STEP

START TEMP. °C

PEAK TEMP. °C

END TEMP. °C

Δm mG

Δm %/a

220.0

223.5

240.5

-0.08400

-2.8160

STEP

START TEMP. °C

PEAK TEMP. °C

END TEMP. °C

Δm mG

Δm %/a

247.5

283.5

318.0

-1.7140

-57.459

FIGURA 156: Curvas de termogravimetría diferencial (A) y termogravimetría (B) de la mezcla física retinal/B-CD.

19-JUL-92 13:05

SCAN PARAMETERS		
START TEMP. °C		30
RATE K/MIN.		10
END TEMP. °C		320
TIME ISO. MIN.		0
PLDT CM		10
RANGE FS mG		10
OFFSET %/a		90
VALVE T/t 1/2		0
SCREEN		
DYN/ISO 1/2		0
IDENT. NO.		2
WEIGHT mG		2.9830

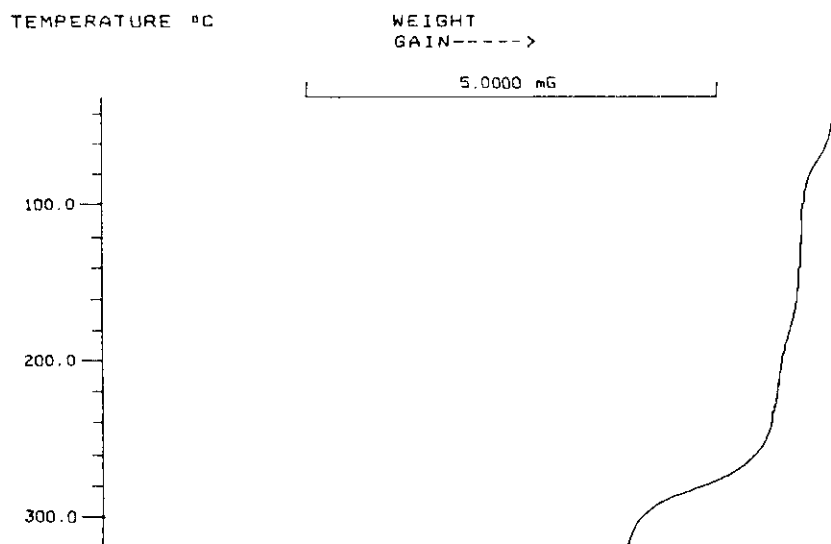


FIGURA 157: Curva de termogravimetría de la β -CD.

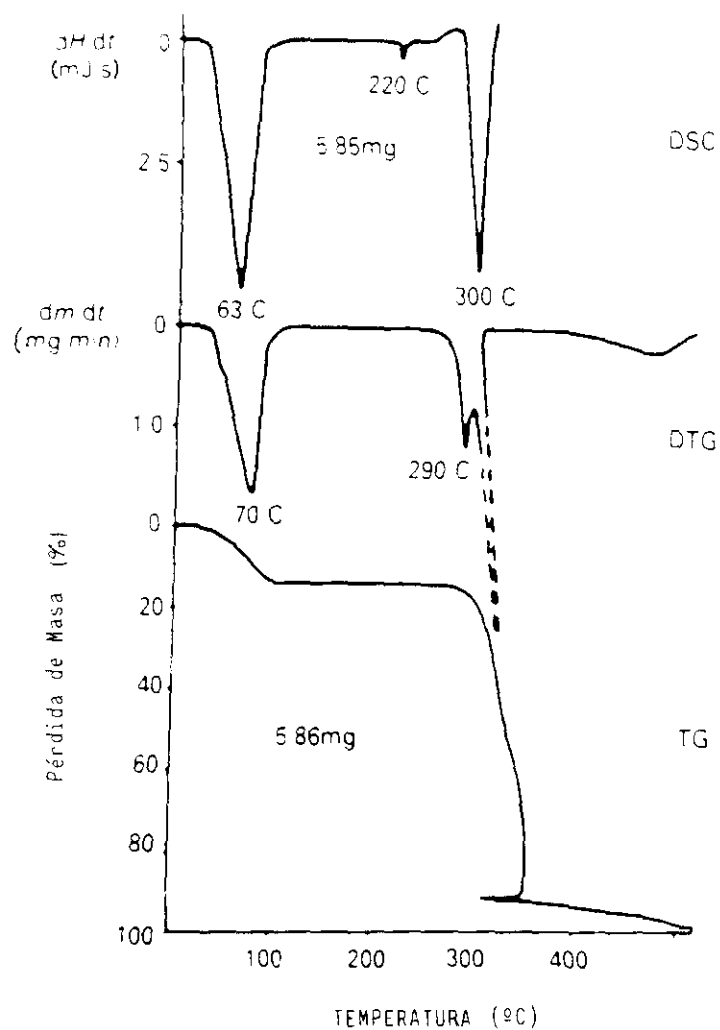


FIGURA 158: Distintos métodos térmicos utilizados en el estudio de la β -CD. TG: estudio por termogravimetría, DTG: estudio por termogravimetría diferencial, DSC: estudio por calorimetría de barrido diferencial.

III.B.2 DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA Y DE LAS CONSTANTES DE ASOCIACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSION DE RETINOIDES CON CICLODEXTRINAS

III.B.2.1 ESTEQUIOMETRIA

Se determinó la estequiometría de los complejos retinoide/CD siguiendo el método de las variaciones continuas [1928 AnnCP 113] [1941 JACS 437]. Se eligió una ciclodextrina como modelo (HP β -CD o β -CD) con cada uno de los retinoides. Dado que la suma de las concentraciones de retinoide + ciclodextrina tiene que ser constante, se ensayaron los niveles 1×10^{-3} M y 1×10^{-2} M. Se observó que cuando la suma de las concentraciones es 1×10^{-3} M, no se obtienen los complejos retinoide/CD en la forma adecuada, probablemente debido a que la concentración de CD no es lo suficientemente alta. Por ello se prepararon los complejos de manera que la suma de las concentraciones finales de la molécula que se iba a incluir y la ciclodextrina se mantiene constante en 1×10^{-2} M.

Hemos de señalar no obstante, que éstas no constituyen las condiciones más apropiadas, ya que el exceso de ciclodextrina, con respecto al retinoide, no es el que habitualmente se utiliza para formar el complejo. Asimismo, dado que la concentración de retinoide es mucho más elevada de lo normal para las relaciones retinal/CD (se llegan a alcanzar valores tan elevados como 8×10^{-3} M), las absorbancias son elevadas y las condiciones de lectura de absorbancia pueden hallarse sujetas a errores que en las condiciones habituales no se producen.

Otro hecho que se puede señalar es que en estos niveles de concentración que son necesarios emplear para el cálculo de la estequiometría, en el caso de la β -CD, como se trabaja al límite de solubilidad de la misma se produce una ligera precipitación del complejo y la determinación espectrofotométrica de las soluciones, puede verse afectada por errores debidos a fenómenos de dispersión de la radiación electromagnética.

Por esta razón y dado que los complejos formados con HP β -CD son más hidrosolubles que los formados con β -CD, se calculó su estequiometría excepto en los casos del retinal y sus isómeros geométricos 9-*cis* y 13-*cis* para los cuales los cálculos se

realizaron con ambas ciclodextrinas, ya que el retinal se ha tomado siempre como molécula modelo para el estudio del proceso de inclusión. Asimismo, se utilizó también la β -CD para el cálculo de la estequiometría en el caso del ácido retinoico, ya que no presentó problemas de solubilización del complejo con esta CD.

Antes de exponer los resultados obtenidos, hemos de señalar, tal y como describe Job al diseñar el método de las variaciones continuas para el cálculo de la estequiometría, que: "los complejos perfectos son prácticamente estables en solución y los imperfectos coexisten en equilibrio con las correspondientes especies libres". Es esta inestabilidad, más o menos apreciable, la que les confiere una actividad y unas características químicas particulares, que probablemente adquieren especial relevancia en el caso de los complejos con ciclodextrinas, donde las fuerzas de unión son extremadamente débiles. En el cálculo de la estequiometría, siguiendo el método de Job, la propiedad del sistema que se evalúa (en nuestro caso la absorbancia) ha de ser independiente de las especies libres. Dado que los retinoides son muy hidrófobos, la lectura de absorbancia debida al complejo no debe por tanto verse afectada por la posible fracción de retinoide libre presente en la solución. No obstante, hemos de tener en cuenta que aún siendo ésta muy pequeña puede constituir una causa de error.

En el caso del retinal, se procedió al cálculo de la estequiometría tanto para la HP β -CD como para la β -CD, como ya hemos señalado antes. Como ya se comentará más adelante, los resultados obtenidos apuntan a una estequiometría distinta para ambas ciclodextrinas. Asimismo, en el caso de la β -CD, dado que a este nivel de concentraciones retinal/CD se produce una precipitación apreciable del complejo con el paso del tiempo, se siguió la metodología que se expone a continuación. En primer lugar, se prepararon los complejos de acuerdo con el procedimiento habitual y transcurrido el tiempo necesario se midieron las absorbancias de estas soluciones.

Los resultados obtenidos, de acuerdo con los cálculos se muestran en la FIGURA 159, que como se puede apreciar indica que la estequiometría del complejo **retinal/ β -CD** es 1:1. Así pues, el máximo de absorbancia y por tanto la máxima formación de complejo, se produce para una relación $[R]/([R] + [CD])$ de 0'5, lo cual implica que la asociación es 1:1. No obstante, la absorbancia presenta un valor exactamente igual a la anterior para una relación molar $[R]/([R] + [CD])$ de 0'4, lo cual puede indicar que algunas moléculas de retinal

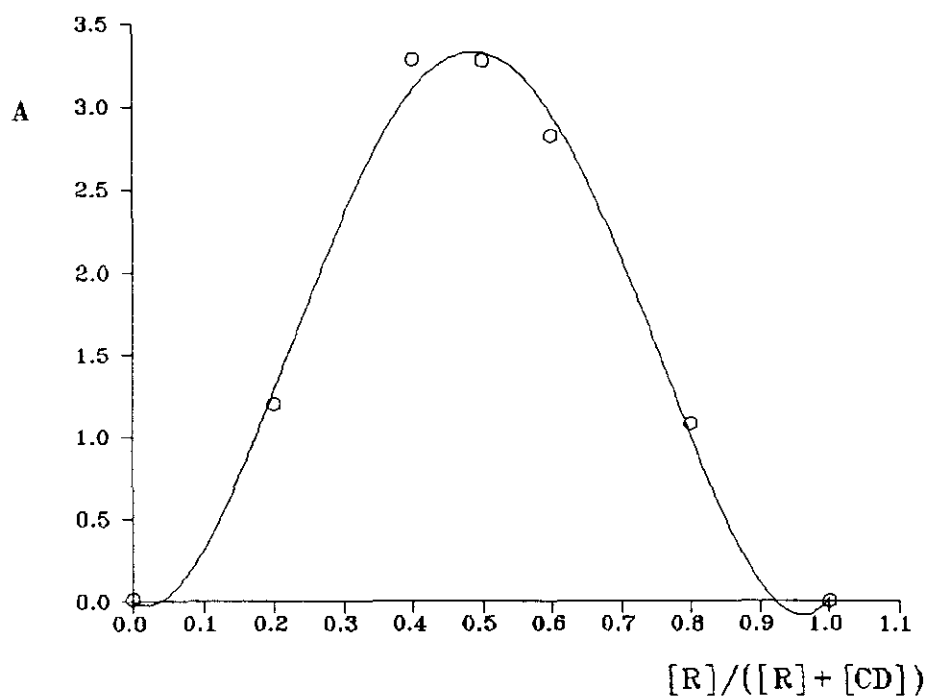


FIGURA 159: Determinación de la estequiometría del complejo todo-trans retinal/ β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

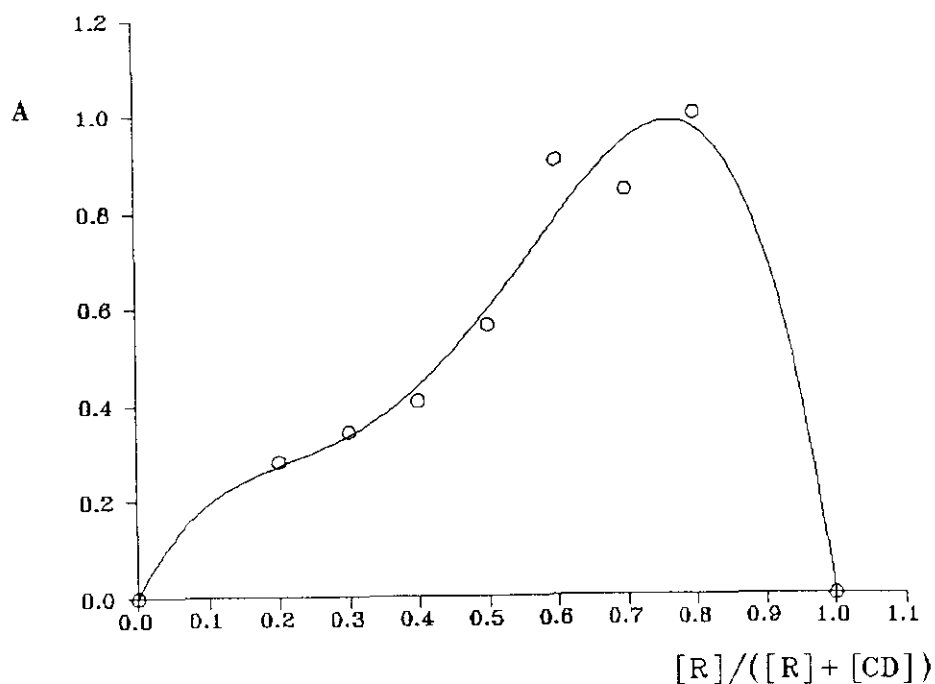


FIGURA 160: Determinación de la estequiometría del complejo todo-trans retinal/ β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. Valores de absorbancia medidos para el sobrenadante. A: absorbancia, [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

podrían estar asociadas a otra molécula más de ciclodextrina. Sin embargo, el ajuste polinomial da el máximo para la estequiometría 1:1, lo cual parece apuntar a que aunque existan algunas moléculas de retinal asociadas a más de una molécula de CD, su proporción es muy baja, y por tanto el resultado global es una estequiometría 1:1.

Dado que se observó una cierta precipitación de este complejo, se centrifugaron las soluciones y se leyeron en el espectrofotómetro UV-VIS los sobrenadantes (FIGURA 160). Los precipitados se redisolviaron en un volumen de agua superior al que se encontraban (10 mL) hasta lograr la disolución completa de los complejos ($V_f = 25$ mL) y estas soluciones fueron igualmente medidas por espectrofotometría de absorción UV-VIS. Los espectros de absorción correspondientes a las soluciones del complejo precipitado y redisoluelto se muestran en la FIGURA 161A-161G.

Los valores de la absorbancia, correspondientes a los sobrenadantes, indican que existen más moléculas de retinal libre que incluido, ya que el máximo que da el ajuste polinomial se encuentra para una relación retinal/(retinal + CD) de 0'8.

Con los valores de absorbancia obtenidos para los complejos precipitados y redisolultos se llevó a cabo la representación gráfica, para el cálculo de la estequiometría (FIGURA 162). Se puede apreciar que el máximo del ajuste se sitúa para una relación molar $[R]/([R] + [CD])$ de 0'3, lo cual indica que la estequiometría del complejo, una vez que ha precipitado, es predominantemente de tipo 1:2 (R/CD). Sin embargo, si observamos detenidamente los puntos de la representación gráfica, podemos apreciar que la máxima absorbancia se presenta para una relación molar $[R]/([R] + [CD])$ de 0'5. Por ello, si bien el ajuste sitúa el máximo para un complejo 1:2 (R/CD), es probable que existan también complejos de estequiometría 1:1.

En la FIGURA 163 se presentan los resultados obtenidos en este estudio de estequiometría para el complejo **retinal/HP β -CD**. Puesto que la hidrosolubilidad de esta ciclodextrina es mayor, no se presentan problemas de solubilización del complejo, ni a altas ni a bajas concentraciones de retinal. El máximo dado por el ajuste polinomial se produce para una relación $[R]/([R] + [CD])$ de 0'35, lo que indica de forma clara que existen el doble de moléculas de ciclodextrina por cada molécula de retinal. Por tanto, la estequiometría del complejo será 1:2 (R/CD).

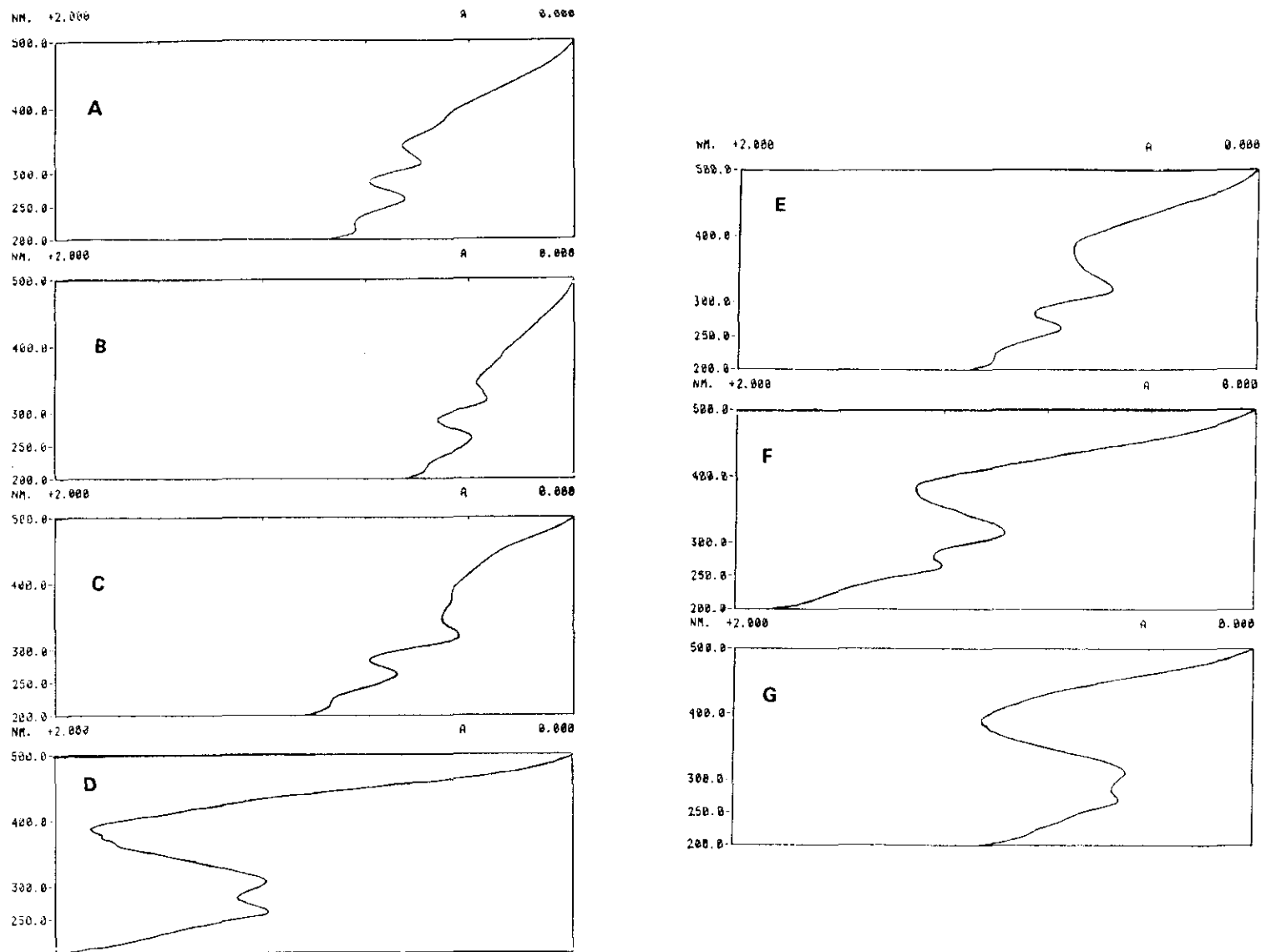


FIGURA 161: Espectros de absorción de los complejos retinal/ β -CD (sólidos), en solución acuosa para distintas concentraciones de retinal: A) $8 \times 10^{-3} M$, B) $7 \times 10^{-3} M$, C) $6 \times 10^{-3} M$, D) $5 \times 10^{-3} M$, E) $4 \times 10^{-3} M$, F) $3 \times 10^{-3} M$, G) $2 \times 10^{-3} M$. $[R] + [CD] = 10^{-2} M$.

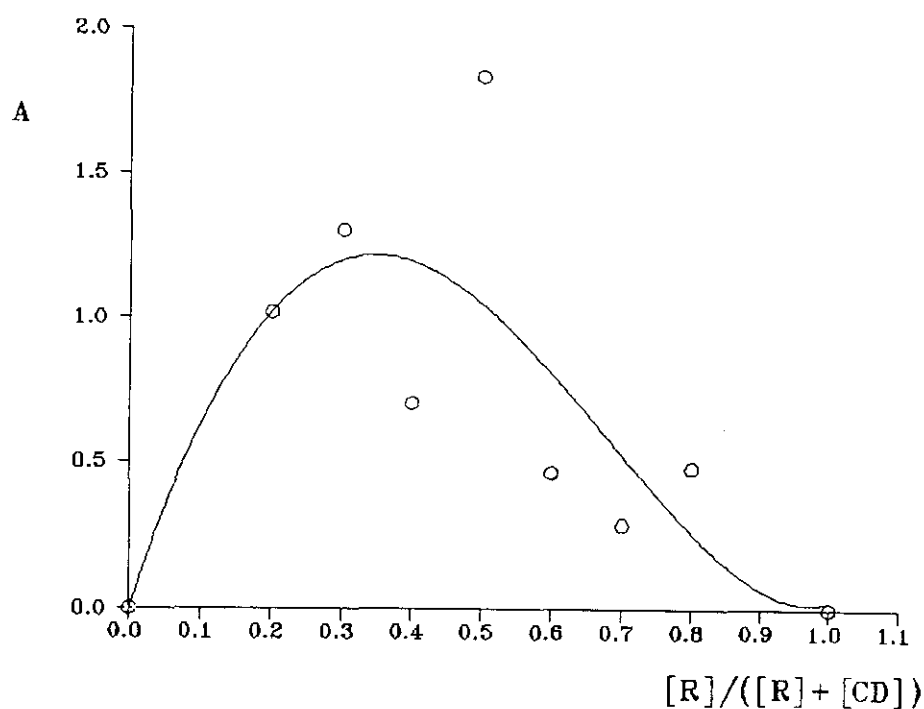


FIGURA 162: Determinación de la estequiometría del complejo todo-trans retinal/ β -CD por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. Valores de absorbancia medidos para las soluciones obtenidas después de redissolver el complejo sólido en agua. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

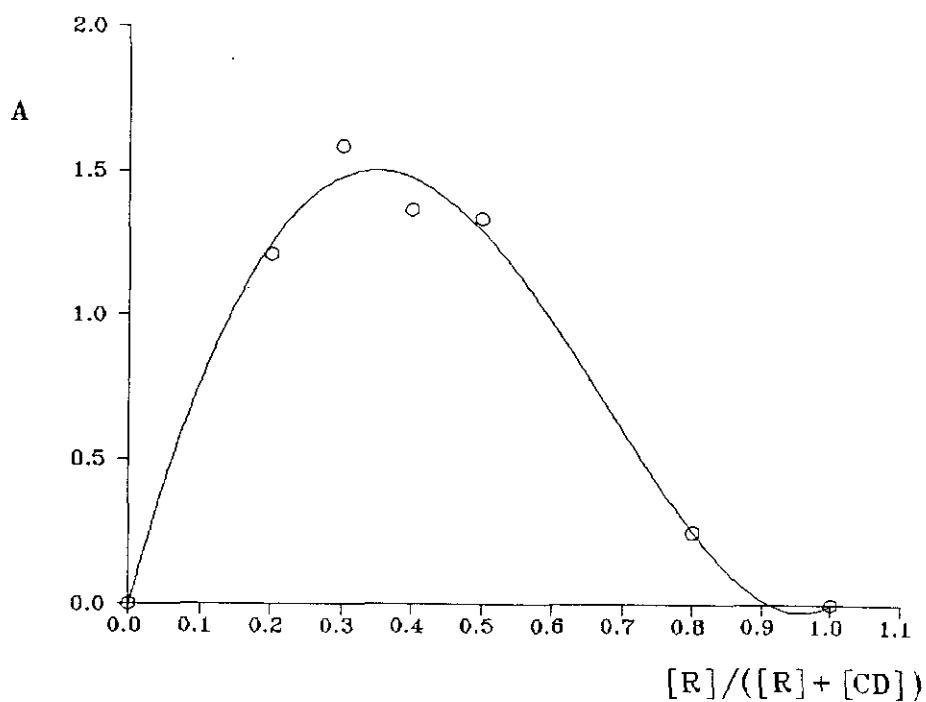


FIGURA 163: Determinación de la estequiometría del complejo retinal/HP β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

Es probable que en el caso de la β -CD, se formen inicialmente en solución complejos de estequiometría 1:1, los cuales van evolucionando lentamente hacia la formación de complejos de estequiometría 1:2 (R/CD). Estos agregados son más insolubles y se produce su precipitación; por ello, la evolución en el tiempo tiende a la formación de complejos de estequiometría 1:2, aunque también pueden coexistir los de estequiometría 1:1. Este comportamiento tendente a la precipitación no se observa en el caso de la HP β -CD.

La formación de estos complejos de estequiometría 1:2 con β -CD explica las pérdidas de peso observadas en los resultados obtenidos por termogravimetría para el complejo de inclusión sólido R/CD y asimismo corroboran los obtenidos por IR y ^1H -RMN, igualmente en el caso de los complejos sólidos.

Los resultados obtenidos para los isómeros geométricos del **13-*cis* y 9-*cis* retinal con β -CD** se muestran en las FIGURAS 164 Y 165 respectivamente. Hemos de tener en cuenta que para ambos isómeros geométricos del retinal, la concentración R + CD fue de 1×10^{-3} M (en vez de 1×10^{-2} M) debido a la escasez de dichos isómeros. La estequiometría para el 9-*cis* parece ser del tipo 1:2 ó 1:3 (R/CD) ya que el máximo de absorbancia se produce para una relación molar comprendida entre 0'2 y 0'3. La dispersión de los puntos, con respecto al ajuste polinomial, es muy apreciable por lo que estos resultados han de tenerse en cuenta pero con ciertas reservas. En el caso del 13-*cis* retinal pueden hacerse consideraciones análogas debido a la gran dispersión de los puntos.

Parece lógico pensar que en estos isómeros, que presentan mayor impedimento estérico, la inclusión sea dificultosa. Sin embargo, estos compuestos son de polaridad más baja que el todo-*trans* retinal, por lo que desde este punto de vista la inclusión estaría favorecida. Teniendo en cuenta que el nivel de concentraciones máximo de ciclodextrina es del orden de 10^{-3} M y estas no son las condiciones óptimas para la formación del complejo, podemos suponer que estos complejos se incluyen en la cavidad de la ciclodextrina, pero no podemos cuantificar de forma exacta cual es la estequiometría de los mismos.

El **retinol con la HP β -CD** presenta un buen ajuste de los datos experimentales y como se aprecia en la FIGURA 166 el máximo de absorbancia se produce para una relación molar $[R]/([R] + [CD])$ de 0'5, lo cual indica que la estequiometría de este complejo es 1:1,

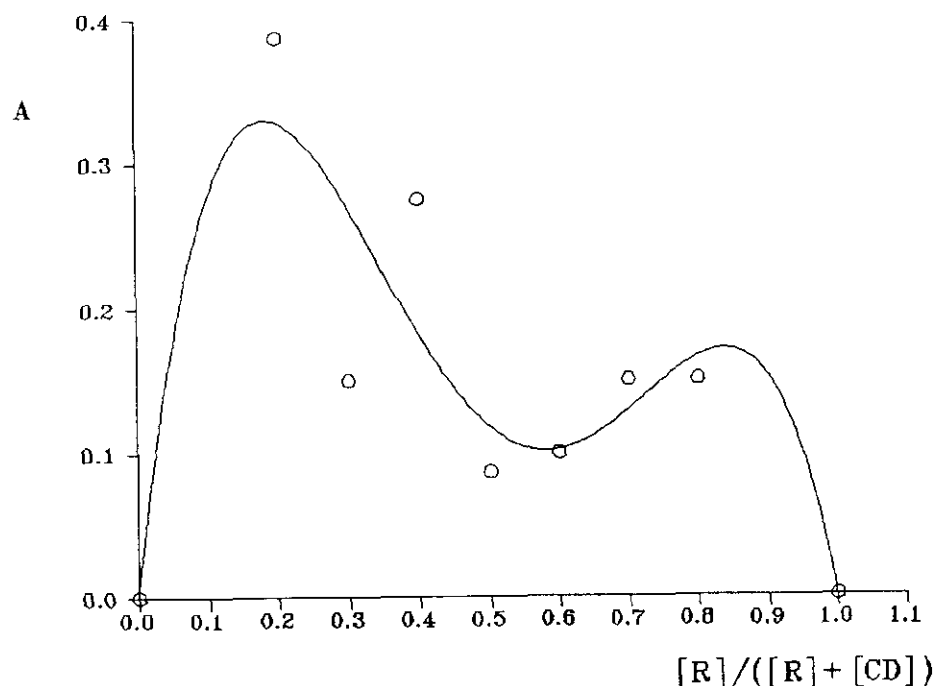


FIGURA 164: Determinación de la estequiometría del complejo 13-cis retinal/ β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-3}M$.

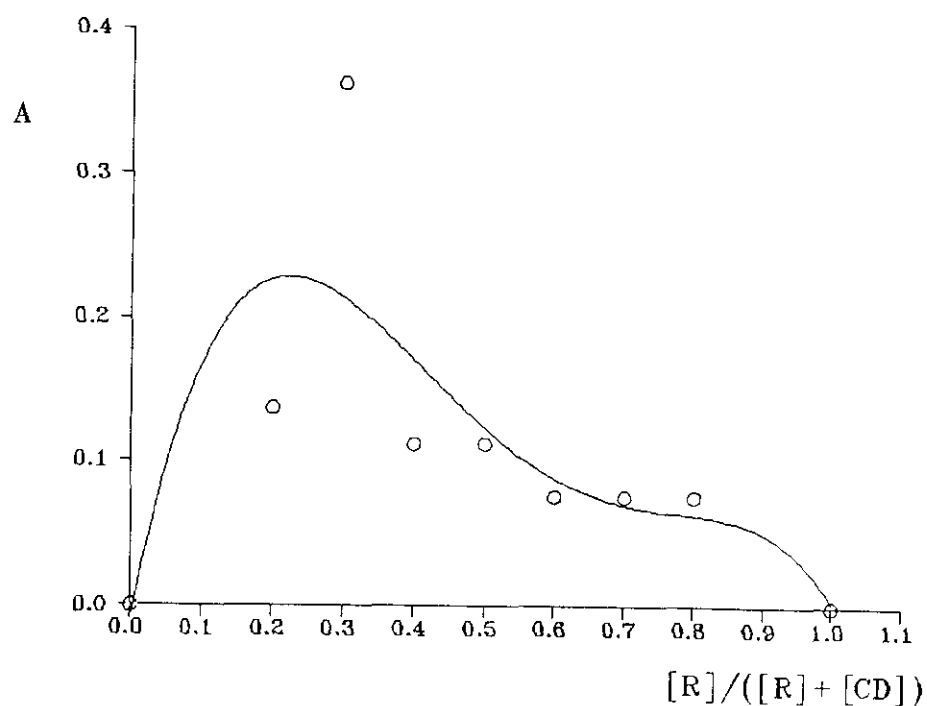


FIGURA 165: Determinación de la estequiometría del complejo 9-cis retinal/ β -CD por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-3}M$.

tal y como podría esperarse si se tienen en cuenta las características de polaridad de esta molécula. Su resto hidrofílico le confiere un carácter más polar que el del retinal y puede pensarse en la formación de complejos donde el anillo de ciclohexeno y parte de la cadena etilénica quedan "encapsulados" en la cavidad de la ciclodextrina, permaneciendo el resto alcohólico en la fase acuosa externa y estabilizándose el complejo gracias a la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua.

Un análogo del retinol, pero de menor polaridad, el **acetato de retinilo** (FIGURA 167), presenta una estequiometría 1:2 (R/CD) con la **HP β -CD**. Por razonamiento análogo al anterior, podemos afirmar que este compuesto, de polaridad menor que la del retinol y ligeramente superior a la del retinal, forma complejos de estequiometría 1:2 al igual que lo hace el retinal en el caso de la HP β -CD. La existencia de esta estequiometría, diferente para la HP β -CD y la β -CD, puede explicarse basándose en las consideraciones de la hidrosolubilidad de los complejos y de la variación en la longitud de la cavidad de la ciclodextrina, como consecuencia de los grupos hidroxipropilo.

Siguiendo razonamientos análogos a los anteriores, el ácido retinoico presenta la polaridad más elevada de los retinoides estudiados, por lo que cabría esperar una relación estequiométrica 1:1. Sin embargo, tal y como se aprecia en la FIGURA 168, los resultados apuntan hacia una estequiometría R/CD 1:2. Además, parece ser que en el caso de β -CD, según se desprende de lo que se observa en el complejo retinal/ β -CD disuelto, está más favorecida una estequiometría 1:1 que para la HP β -CD. Sin embargo los resultados indican de forma evidente que la estequiometría no es la anteriormente indicada. Existen otros ácidos alifáticos de cadena larga así como moléculas de gran tamaño, para los que se han descrito también relaciones estequiométricas 1:2 (X/CD), por lo que no debe sorprendernos la relación estequiométrica obtenida.

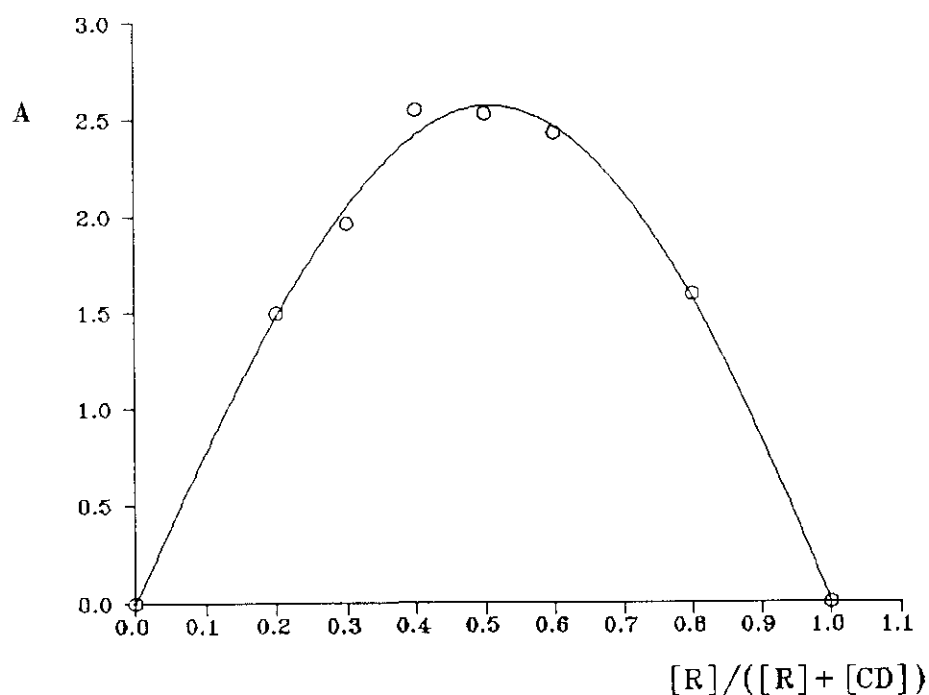


FIGURA 166: Determinación de la estequiometría del complejo retinol/HP β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

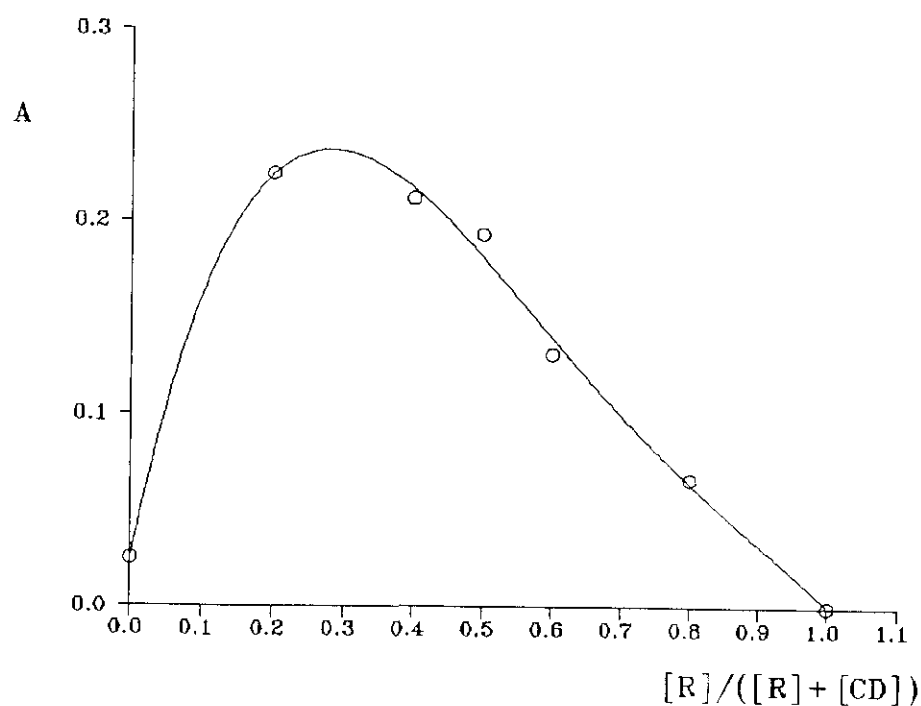


FIGURA 167: Determinación de la estequiometría del complejo acetato de retinilo/HP β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

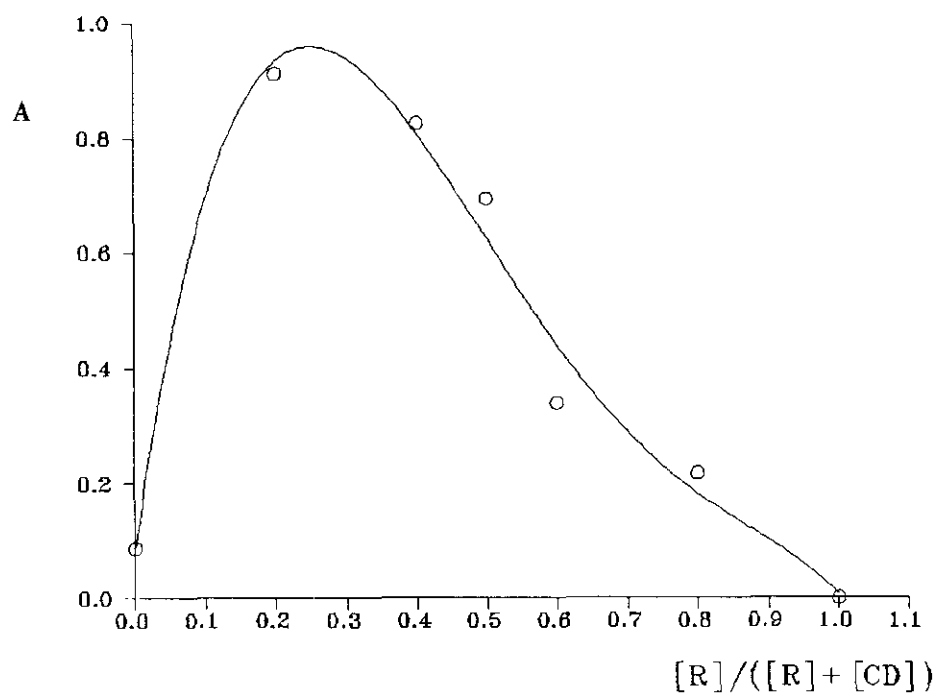


FIGURA 168: Determinación de la estequiometría del complejo ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa por el método de las variaciones continuas según el procedimiento descrito en la metodología. A: absorbancia. [R]: concentración molar de retinoide, [CD]: concentración molar de ciclodextrina, $[R] + [CD] = 10^{-2}M$.

III.B.2.2 CONSTANTES DE ASOCIACION

En las FIGURAS 169 a 177 se muestran los resultados obtenidos para el cálculo de las constantes de asociación de los complejos con β -CD e HP β -CD y los retinoides estudiados. Se llevó a cabo este estudio con ambas ciclodextrinas a fin de verificar si las distintas características de las cavidades de la β -CD y la HP β -CD afectan al proceso de inclusión.

Se siguió el procedimiento descrito por Benesi-Hildebrand para el cálculo de estas constantes y la técnica empleada para dicho cálculo fue la espectrofotometría de absorción UV-VIS. En consecuencia se procedió a la representación gráfica del doble recíproco de la absorbancia y la concentración. Según se describe en la bibliografía [1982 L XXXIV] al hacer esta representación gráfica debe obtenerse una línea recta, de la cual se puede deducir el valor de la constante de asociación ($K_a = m/b$, siendo b la ordenada en el origen y m la pendiente de la recta) o bien su inversa, la constante de disociación del complejo ($K_d = b/m$).

Pueden obtenerse líneas rectas aceptables al representar $1/A$ frente a $1/C$, tanto para complejos con estequiometría 1:1 como para complejos con estequiometría 2:1 (CD/molécula huésped) si bien en el caso de la estequiometría 2:1 la linealidad no tiene por qué ser buena. Este método puede dar una idea aproximada acerca de la estequiometría de los complejos pero nunca es concluyente con respecto a este tema y sin embargo es el adecuado para el cálculo de las constantes de equilibrio. Por ello, en nuestro caso llevamos a cabo paralelamente las experiencias correspondientes al cálculo de las relaciones estequiométricas.

Con las experiencias realizadas para el cálculo de las constantes de asociación, se procedió a la representación gráfica del doble recíproco con $1/A$ frente a $1/C$ y se obtuvieron coeficientes de correlación del orden de 0'8, por lo que a la vista de estos resultados y de los obtenidos en los cálculos de la estequiometría, se procedió a realizar la representación gráfica del doble recíproco con $1/A$ frente a $1/C^2$, puesto que los datos estequiométricos en muchos casos indican claramente una estequiometría 2:1 (CD/R). En este caso los coeficientes de correlación son del orden de 0'95. Aunque desde un punto de vista estricto esto no supone una buena correlación lineal, sin embargo permite el

cálculo de las constantes de asociación aparentes de los complejos. Los resultados obtenidos ($\log K$) se presentan en la TABLA IX.

Los valores que se han hallado para las constantes de asociación son elevados, de un orden de magnitud igual o superior a los obtenidos para los complejos ternarios β CD/pireno/alcoholes [1988 JIP 277] y también para una amplia variedad de compuestos de estructura química compleja, como la progesterona ($K = 13.200$), la espironolactona ($K = 27.500$), la digoxina ($K = 11.200$) y la clorpromazina ($K = 12000$) y que en la mayoría de los casos originan complejos de estequiometría 2:1 (CD/molécula huésped) como se muestra en la TABLA X. Estos datos implican, que una vez formado el complejo, la asociación entre las ciclodextrinas y las moléculas de retinoide es muy fuerte y por tanto los complejos formados son muy estables. Sin embargo, ninguna de las consideraciones que se realizan en este apartado son válidas en el caso del retinol, ya que para este compuesto, debido a la gran dispersión de los datos experimentales, no se pudo proceder al cálculo de las constantes de asociación.

Las constantes más elevadas se obtienen para el todo-*trans* retinal, seguido de sus isómeros (9-*cis* y 13-*cis*). Dado que todos los isómeros forman complejos de inclusión muy estables con la β -CD, parece que la distinta geometría molecular de los tres no es el factor determinante en el proceso de inclusión. En el caso del 9-*cis* retinal no se llevó a cabo el cálculo de la constante de asociación con la HP β -CD, debido a la imposibilidad de detectar la formación del complejo. Considerando la disposición espacial del 9-*cis* retinal y teniendo en cuenta que la cavidad de la HP β -CD es mucho más alargada que la de la β -CD debido a la sustitución por los grupos hidroxipropilo, es muy probable que resulte estéricamente impedida la formación del complejo de inclusión para este isómero o si se forma, la penetración de la molécula huésped no sea efectiva. Así pues, en las distintas experiencias encaminadas a la formación del complejo de este isómero con HP β -CD no se obtiene resultado alguno.

Por otra parte, si se comparan los valores de las constantes de asociación del todo-*trans* retinal y el 13-*cis* retinal con las dos ciclodextrinas estudiadas, se observa que el isómero *trans* sigue un comportamiento semejante a sus análogos (ácido y éster) de geometría todo-*trans*; es decir, para todos ellos la constante de asociación es menor en el

caso de la HP β -CD que en el de la β -CD. Sin embargo, el 13-*cis* retinal presenta valores muy semejantes para la HP β -CD y la β -CD.

En el caso de la β -CD debe tenerse en cuenta que para todos estos retinoides la disposición es todo-*trans* y el impedimento estérico, con respecto a la inclusión, es muy reducido, debido a la disposición en el plano de la molécula, por lo que la inclusión debe llevarse a cabo de un modo similar. Si ésto es así, podemos suponer que la parte más hidrofóbica de la molécula, es decir el anillo de ciclohexeno y parte de la cadena etilénica, los que penetran en la cavidad de la ciclodextrina. No obstante, los valores de las constantes de afinidad para la β -CD y los distintos retinoides todo-*trans* son distintos, por ello si la parte incluida es análoga en todas las moléculas hay que buscar la causa de esta diferencia en el grupo funcional característico de cada una de ellas. Este grupo es el origen de apreciables diferencias de solubilidad de estos retinoides. Como para que se produzca la inclusión las moléculas adheridas a la pared del matraz han de pasar a la solución antes de incluirse, aquellos derivados que sean menos hidrosolubles tenderán a incluirse con mayor fuerza en la cavidad hidrofóbica, pero también tendrán una mayor dificultad para acceder a la solución acuosa y posteriormente formar el complejo. Todo ello explica la variabilidad de los resultados a la hora de obtener el complejo, ya que entran en juego dos procesos competitivos, pudiendo ser la polaridad el factor determinante.

En consecuencia, la mayor constante de afinidad debería presentarse en el caso del compuesto cuyo extremo hidrofílico (ácido, alcohol, éster o grupo carbonílico) de lugar a un derivado que presente la solubilidad más baja en agua. Si comparamos el orden de polaridad: ácido > alcohol > carbonilo > acetato, el acetato de retinilo, por ser el más apolar, debería tener la constante de asociación más alta. Sin embargo, al ser más soluble en agua que el retinal y el ácido retinoico, la molécula más fácilmente incluida es el retinal, seguida del ácido en función de sus características geométricas y fundamentalmente de su hidrofobicidad. Estos mismos hechos pueden justificarse si se tienen en cuenta los comportamientos análogos descritos en la bibliografía. Se puede observar por ejemplo, que existen complejos de inclusión cuyas constantes de asociación son más elevadas para las formas más polares que para las apolares. Se han de comparar en estas circunstancias las obtenidas para el ion *p*-nitrofenolato, más polar ($K_d = 4 \times 10^{-4}$) y el *p*-nitrofenol menos polar ($K_d = 5.3 \times 10^{-2}$) con β -CD (FIGURA 178).

Para la HP β -CD, los valores de las constantes de asociación son aproximadamente dos órdenes de magnitud menores que los obtenidos para los respectivos complejos con β -CD. En la TABLA XI se muestra la relación entre log K para los complejos retinoides/ β -CD y retinoides/HP β -CD y las refracciones molares de dichos retinoides. Se aprecia que en el caso de los complejos con β -CD, disminuye el valor de las constantes de asociación al aumentar la refracción molar de los compuestos incluidos. Este comportamiento podría relacionarse con la facilidad del proceso de inclusión según la polarizabilidad de la molécula, ya que la refracción molar está íntimamente relacionada con la polarizabilidad. Estas moléculas con dobles enlaces conjugados son polarizables por la cavidad de la β -CD y parece que este efecto es más importante en el caso del retinal que presenta una mayor constante de asociación. En el caso de los complejos con la HP β -CD no pudo establecerse una relación similar entre log K y refracción molar.

Teniendo presente que la HP β -CD es más hidrosoluble y que su cavidad es menos apolar, la fuerza del enlace en las proximidades del radio de Van der Waals puede ser menor lo que explica que la tendencia a la inclusión sea más baja. El orden de los valores de las constantes de asociación obtenidas con estos retinoides debería dar lugar a un valor de la constante de asociación más elevado para el ácido que el que se obtiene (en concreto mayor que para el acetato y menor que para el retinal por razonamientos análogos a los anteriores). Sin embargo, a lo largo del trabajo experimental se ha podido constatar que la formación de un complejo con el ácido retinoico y la HP β -CD es muy dificultosa, lo cual podría explicar el bajo valor de la constante de asociación. La razón por la cual la formación del complejo no es fácil, no se deduce de forma evidente de los datos experimentales ni de las bases teóricas que apoyan la formación de los complejos de inclusión. Pensamos que se pueden establecer repulsiones electrostáticas, entre los grupos hidroxipropilo de la HP β -CD y los grupos carboxílicos del ácido, que dificulten la formación del complejo, haciendo que disminuya sensiblemente el valor de K_a . La formación de enlaces por puentes de hidrógeno podría asimismo favorecer el hecho de que el ácido retinoico quede "pegado" a la ciclodextrina, pudiendo formarse un complejo bastante inestable (FIGURA 179).

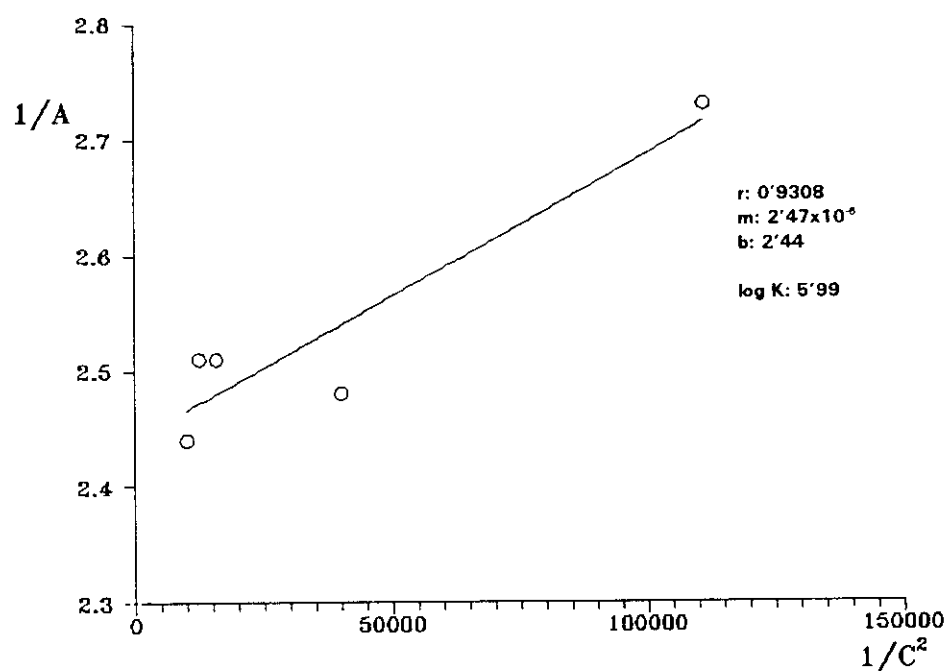


FIGURA 169: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo todo-trans retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

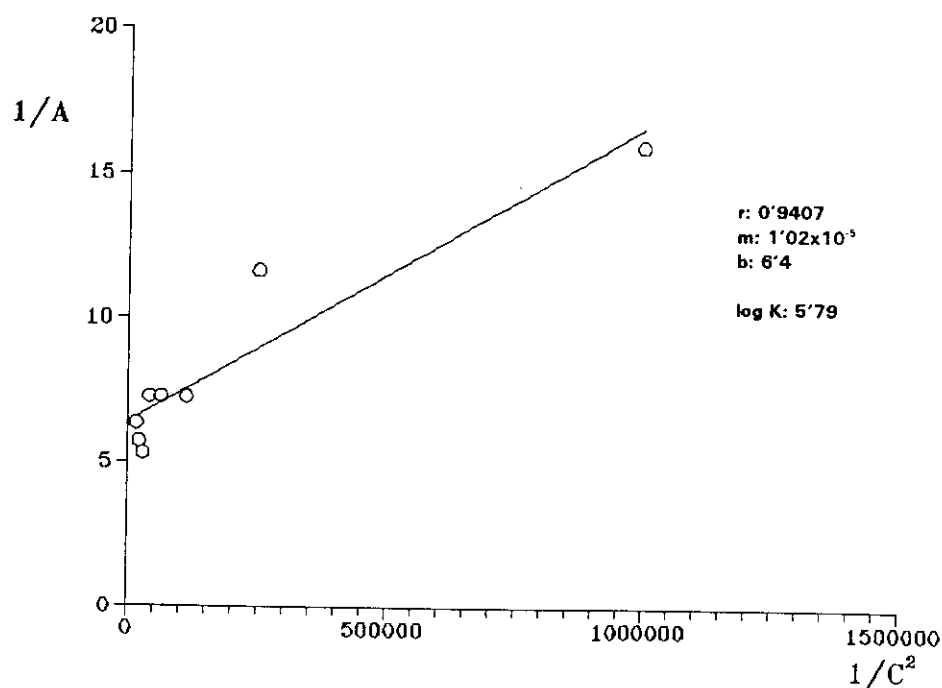


FIGURA 170: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo 13-cis retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

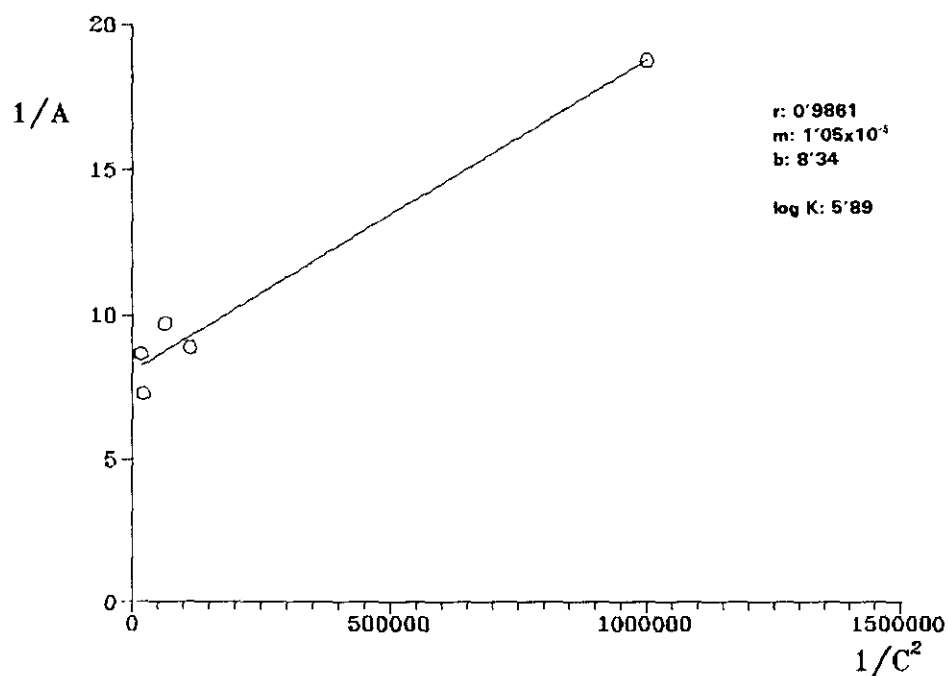


FIGURA 171: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo 9-cis retinal/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

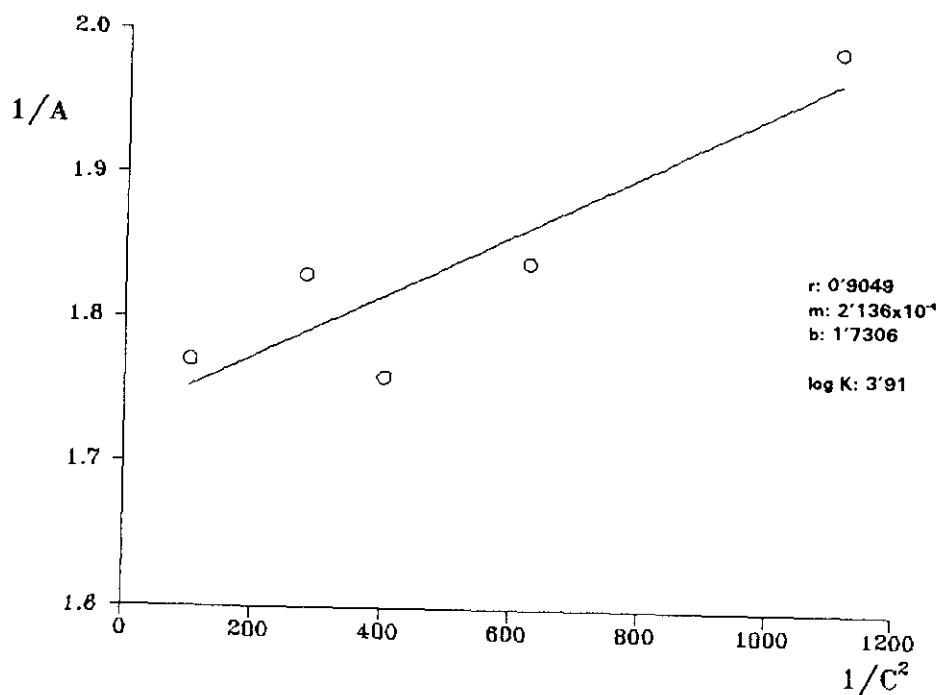


FIGURA 172: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo todo-trans retinal/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

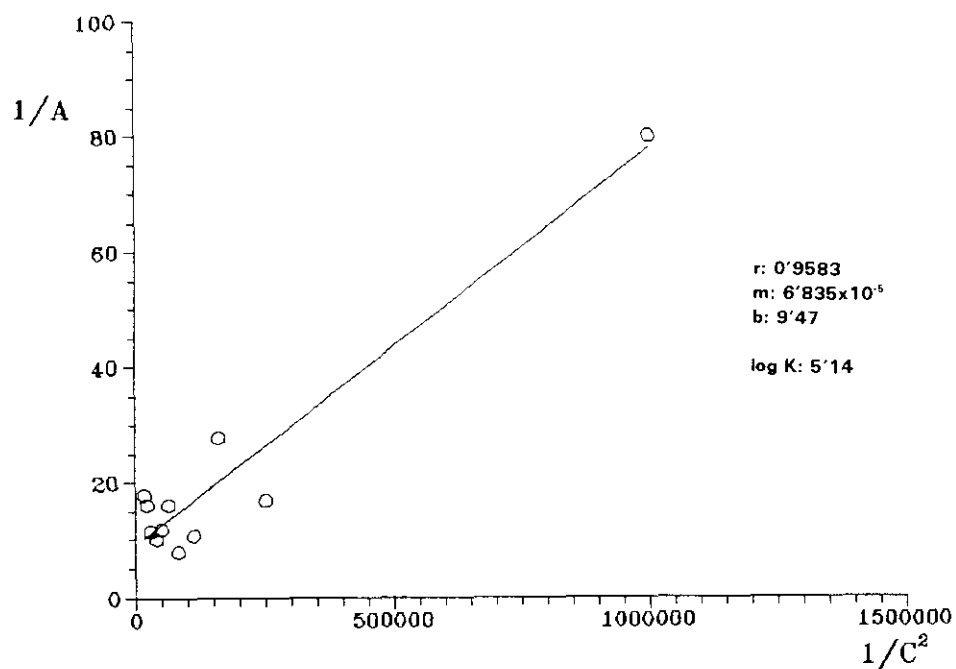


FIGURA 173: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo 13-cis retinal/HPβ-CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

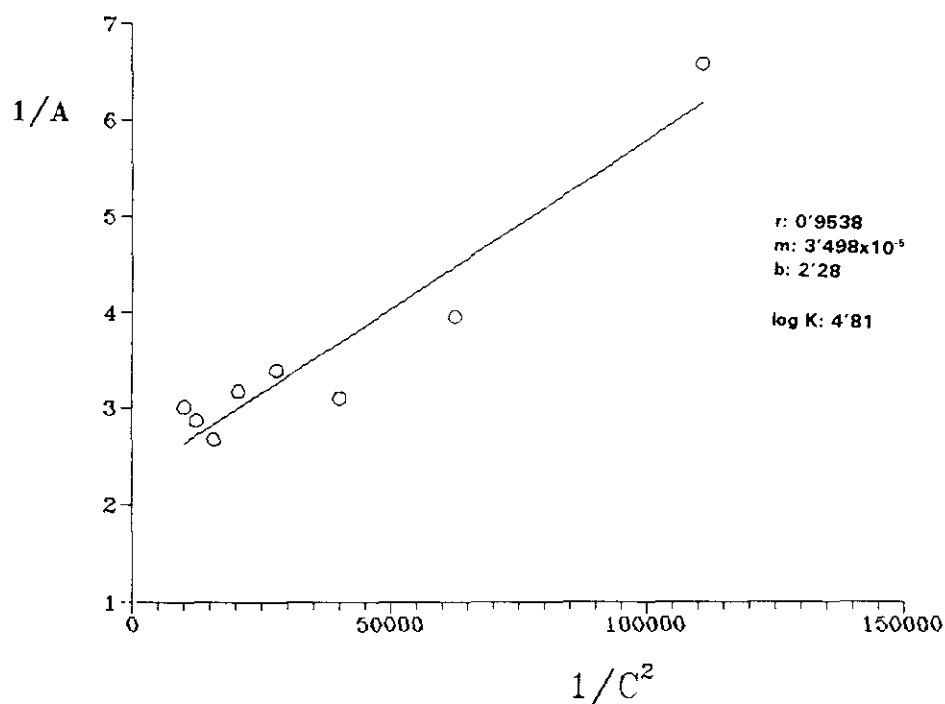


FIGURA 174: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo acetato de retinilo/β-CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

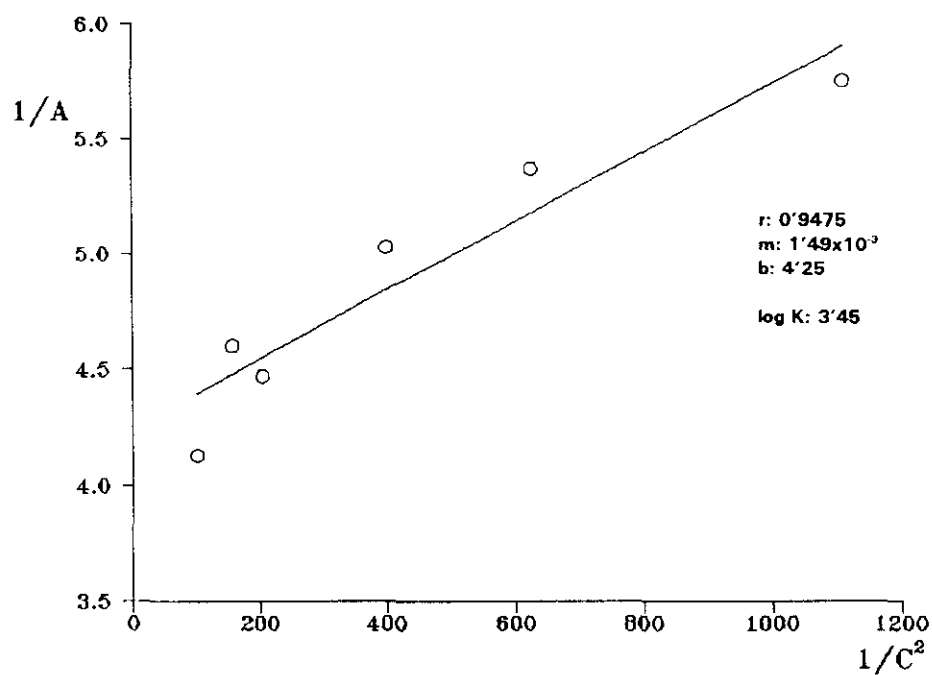


FIGURA 175: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo acetato de retinilo/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

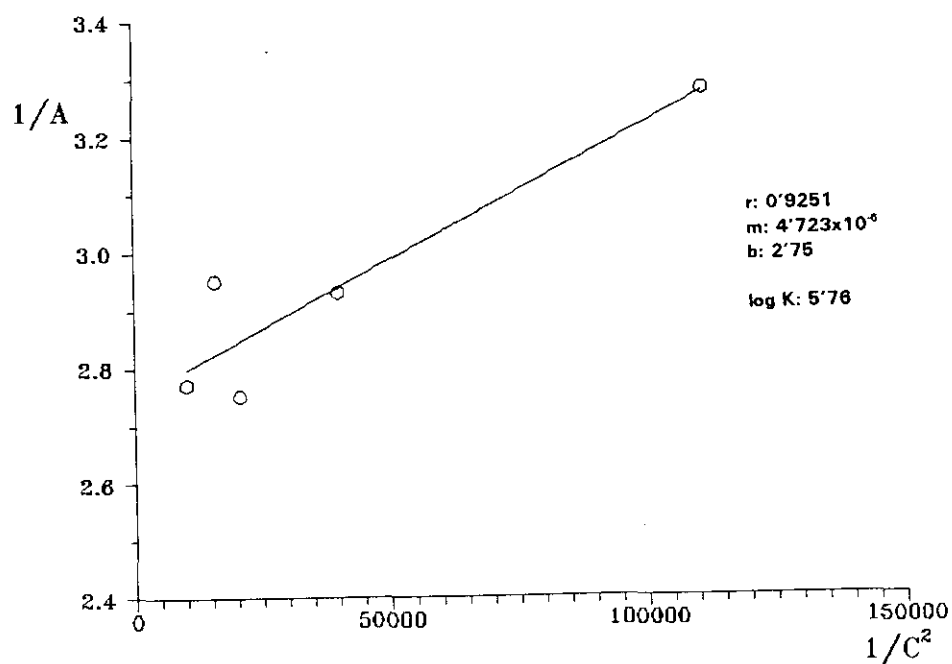


FIGURA 176: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo ácido retinoico/ β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).

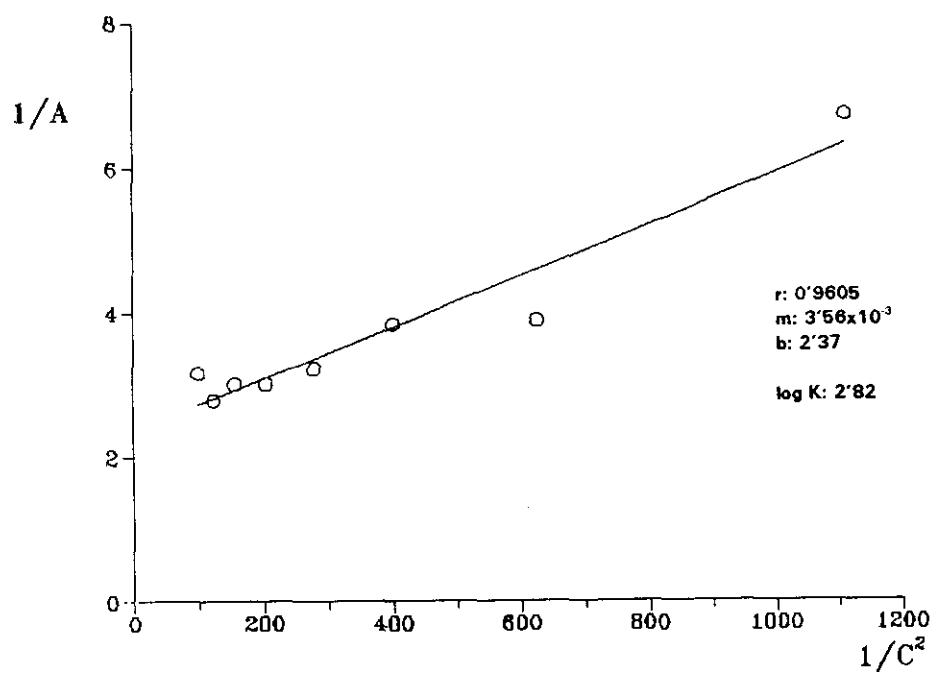


FIGURA 177: Representación del doble recíproco para el cálculo de la constante de asociación del complejo ácido retinoico/HP β -CD en solución acuosa. A: absorbancia, C: concentración (M).



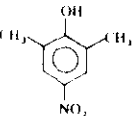
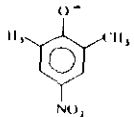
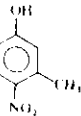
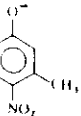
Molécula huésped	K_d ($10^{-2}M$)
	5'3
	0'040
	0'18
	0'0094
	(*)
	4'2

FIGURA 178: Constantes de disociación (K_d) para los complejos de inclusión de α -CD con derivados de *p*-nitrofenol y sus correspondientes aniones. (*) no se forma complejo.

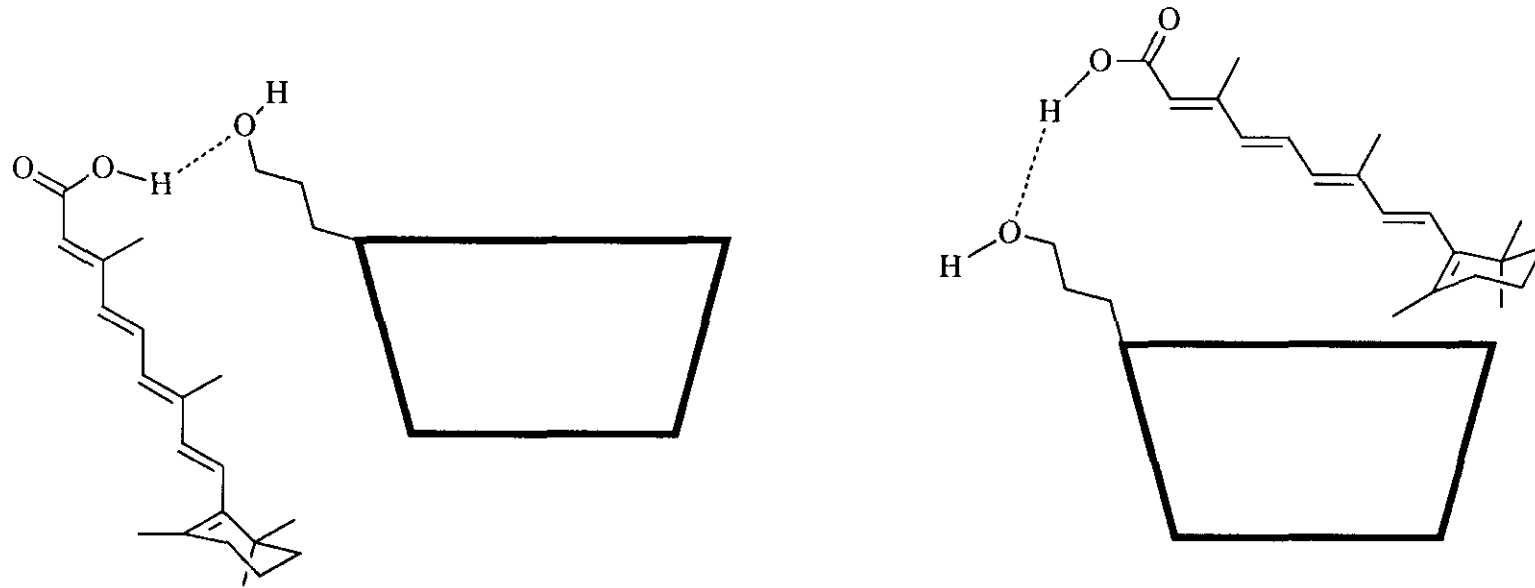


FIGURA 179: Modos de interacción propuestos para explicar el comportamiento observado en el caso de los complejos entre el ácido retinoico y el retinol y la HPβ-CD.

COMPLEJO	1	2	3	4	5	6	7	8	9
log K	5'99	3'91	5'79	5'14	5'89	4'81	3'45	5'76	2'82

TABLA IX: Valores de constantes de asociación (log K) para los distintos complejos formados. 1: todo-trans retinal/ β CD, 2: todo-trans retinal/HP β -CD, 3: 13-cis retinal/ β -CD, 4: 13-cis retinal/HP β -CD, 5: 9-cis retinal/ β -CD, 6: acetato de retinilo/ β -CD, 7: acetato de retinilo/HP β -CD, 8: ácido retinoico/ β -CD, 9: ácido retinoico/HP β -CD.

FARMACO	α -CD		β -CD		γ -CD	
	Kc	E	Kc	E	Kc	E
prostagladina E1	1430		1700		530	(2/1)
prostaglandina E2	560		1270			
prostaglandina F _{2α}	250		1240		480	(1/1)
progesterona	150		13300	(2/1)	24000	(3/2)
testosterona	130		7540	(3/2)	16500	(2/1)
digoxina	180		11200		12200	(4/1)
digitoxina	290		17000		63600	(4/1)

TABLA X: Constantes de estabilidad (Kc) y estequiometría E (CD/fármaco) de los complejos de inclusión entre distintos fármacos y ciclodextrinas.

	log K _{β-CD}	log K _{HPβ-CD}	R
Todo-trans retinal	5'99	3'91	82'726
Acetato de retinilo	4'81	3'45	93'663
Acido retinoico	5'76	2'82	84'251

TABLA XI: Valores de los logaritmos de las constantes de asociación (K) de los complejos con la β -CD y la HP β -CD con distintos retinoides y de la refracción molar (R) de los citados retinoides.

III.B.3 VENTAJAS DERIVADAS DE LA FORMACION DE COMPLEJOS DE INCLUSION DE RETINOIDES CON CICLODEXTRINAS

III.B.3.1 ESTUDIO DE LOS PROCESOS DE FOTOISOMERIZACION DE RETINOIDES EN MEDIOS HOMOGENEOS ORGANIZADOS POR HPLC

La fotoisomerización del retinal es uno de los procesos más importantes que tienen lugar en la química de la visión. De entre todos los retinoides, la isomerización del retinal es extremadamente rápida [1984 L VII]. Dado que esta fotorreacción transcurre muy fácilmente, es obvio que la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas puede suponer un impedimento a la misma. Si, por el contrario, se considera la actividad catalítica de estos derivados macrocíclicos, podría ocurrir que se facilitase el proceso de isomerización. A partir de estas consideraciones procedimos a la cuantificación de los fotoproductos originados tras la irradiación, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), ya que esta técnica permite su identificación y cuantificación.

Basándonos en los datos bibliográficos [1980 VR 355] [1981 PP 267] el orden de salida de los isómeros del retinal en fase normal, de menor a mayor tiempo de retención, es: 13-*cis* < 11-*cis* < 9-*cis* < 7-*cis* < todo-*trans*. Para el ácido retinoico en fase inversa la asignación de los picos se llevó a cabo según lo descrito [1989 JC 255] y el orden de salida de menor a mayor tiempo de retención para los isómeros es : 11,13-dicis < 13-*cis* < 11-*cis* < 9-*cis* < 7-*cis* < todo-*trans*. Hacemos referencia al eluyente así como a la columna empleada, tal y como se describe en la bibliografía, ya que un cambio en la fase móvil, empleando el mismo tipo de columna, conlleva alteraciones en el orden de salida de los isómeros [1988 PP 831]; así: 11,13-dicis < 11-*cis* < 13-*cis* < 9-*cis* < todo-*trans*. Como puede observarse en este caso, el tiempo de retención para el isómero 11-*cis* es menor que para el isómero 13-*cis* (FIGURA 180).

En nuestro caso logramos la separación de los isómeros del ácido retinoico en fase inversa utilizando el sistema cromatográfico descrito en el apartado III.A. 2.3, siguiendo el protocolo desarrollado por Motto y col. [1989 JC 255]. Se eligió este método porque la separación entre los distintos isómeros es mayor, alcanzándose una mejor resolución.

Comentaremos a continuación los resultados obtenidos en el caso del **retinal**. Inicialmente se planteó este estudio con la finalidad de verificar que, tras el proceso de formación del complejo con ciclodextrinas, la isomerización no es mayoritaria. Si comparamos los resultados obtenidos "a tiempo cero", para las soluciones homogéneas (hexano, etanol, acetonitrilo), se observa que aparecen mayores cantidades de los isómeros en medios organizados (ya sean micelas o ciclodextrinas) que en medios homogéneos (FIGURA 181). Hemos de considerar que a tiempo cero, las soluciones homogéneas son comparables con las de los medios organizados sólo parcialmente, ya que mientras que estas últimas llevan preparadas 24 horas y han sido sometidas al proceso de agitación, las soluciones en disolventes se han preparado justo antes de su separación cromatográfica.

De los resultados obtenidos en los distintos disolventes, es en el caso del etanol (polar prótico) donde a tiempo cero se obtiene un mayor porcentaje de isómeros, resultando ésto especialmente significativo en el caso del 13-*cis* retinal. En la oscuridad y sin agitación, se pudo comprobar (FIGURA 182) que la solución etanólica de 9-*cis* retinal sin irradiar, transcurrida una hora desde su preparación, da lugar a la aparición de isómeros, lo cual indica como ya han señalado algunos autores que la isomerización es más fácil en el seno de los disolventes polares [1970 PP 249].

En los medios organizados, tanto en el caso de las micelas como de las ciclodextrinas, el porcentaje de isomerización a tiempo cero es del orden del 10%. Estos resultados podrían deberse, a que el proceso de agitación necesario para producir la inclusión en la cavidad de la ciclodextrina facilite la isomerización, o como acabamos de comentar, al entorno polar prótico de las soluciones acuosas que, junto con el tiempo transcurrido, pueden acelerar la isomerización.

En los ensayos de fotoisomerización del todo-*trans* retinal, se pudo comprobar que en general tras 60 minutos de irradiación, el isómero mayoritario es el 13-*cis* retinal, excepto en el caso del acetonitrilo donde el isómero que aparece en mayor proporción es el 11-*cis* retinal (FIGURA 183).

La transformación del todo-*trans* retinal en sus correspondientes fotoisómeros es más significativa en los tensoactivos, donde alcanza valores análogos a los obtenidos en acetonitrilo y etanol. La transformación es menor en el caso de las ciclodextrinas (FIGURA

184) y donde se obtiene menor porcentaje de fotoisomerización es en el caso del hexano. Si se compara la transformación con el tiempo, del todo-*trans* retinal en los distintos medios, puede apreciarse que la fotoisomerización es mucho más apreciable en el seno de los medios micelares (FIGURA 185) seguido de los disolventes y finalmente la menor transformación se produce en el caso de las ciclodextrinas. Por ejemplo, para la solución de Brij-35, el isómero todo-*trans* disminuye en un 40%, si se comparan los resultados obtenidos a tiempo cero y tras 60 minutos de irradiación. Para la solución en hexano, la disminución es de un 22% mientras que para las distintas soluciones de ciclodextrinas, la isomerización del todo-*trans* retinal tras la irradiación es sólo de un 8 a un 15% (TABLA XII).

De estos resultados puede deducirse que las ciclodextrinas son los sistemas que impiden de forma más eficaz el proceso de fotoisomerización. Esto puede explicarse si se considera que, en el complejo de inclusión, la libertad de rotación de la molécula de retinal está dificultada debido al medio constreñido que la envuelve. Sin embargo en las micelas, que pueden considerarse como sistemas dinámicos, donde la inclusión de la molécula en la capa apolar interna es menos fija, la capacidad de rotación de la molécula de retinal no está impedida, lo cual explica que la fotoisomerización transcurra sin dificultad [1988 JPPA 329].

No obstante en este caso de las micelas, la fotoisomerización es más fácil que en hexano y semejante a la que se produce en el caso del etanol o el acetonitrilo. Todo ello puede explicarse si se tienen en consideración las características de polaridad del entorno. Puesto que los medios polares facilitan la fotoisomerización parece lógico pensar que en un medio acuoso (elevada polaridad) si la molécula no se encuentra en un entorno rígido la isomerización transcurre más rápida y fácilmente.

En el caso de las ciclodextrinas el disolvente es agua. Por tanto el medio es polar prótico; sin embargo a diferencia de las micelas, una vez que se ha producido la inclusión del retinal en la cavidad de la ciclodextrina, el entorno que le rodea es apolar y además las moléculas incluidas se encuentran atrapadas en un espacio reducido. En las micelas, al tratarse de un sistema dinámico las moléculas de retinal entran y salen de la fase apolar interna y por tanto cuando quedan en el exterior quedan más expuestos a la fotoisomerización.

Si se comparan los porcentajes de isómeros existentes, a tiempo cero y tras 60 minutos de irradiación, podemos afirmar que los bajos porcentajes de isómeros que aparecen en las soluciones de partida, son una consecuencia del proceso de agitación, ya que las soluciones se miden tras 24 horas de agitación, pero han sido mantenidas en completa oscuridad y por tanto no es la luz, sino la agitación y el tiempo transcurrido, los que pueden facilitar la aparición de los isómeros. Sin embargo, al cabo de 60 minutos de irradiación la presencia de isómeros es debida a la luz, ya que el porcentaje inicial de partida de algunos de los isómeros es despreciable, frente a los porcentajes que se obtienen por irradiación. Además se ha esperado un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio fotoestacionario.

Por tanto, en estas condiciones las distintas soluciones son comparables entre sí y los resultados obtenidos como consecuencia del proceso de irradiación son muy indicativos. Por consiguiente, la formación del complejo de inclusión con las ciclodextrinas, protege de forma efectiva a las moléculas de retinal con respecto a la fotoisomerización.

El **13-*cis*** y el **9-*cis* retinal**, dos compuestos utilizados como patrones para poder identificar su presencia en los procesos de isomerización, fueron estudiados desde el punto de vista de la isomerización en medios homogéneos (hexano y etanol). En el caso del **13-*cis* retinal**, el equilibrio fotoestacionario se alcanza más lentamente que en el caso del **todo-*trans* retinal**. Sin embargo, el comportamiento para el isómero **9-*cis*** es el contrario, tal y como se desprende de los resultados que se presentan en las TABLAS XIII y XIV.

Paralelamente se llevaron a cabo los ensayos de fotoisomerización para el **retinol** y el **acetato de retinilo** en medios homogéneos y organizados. Los resultados obtenidos son de escasa relevancia, ya que estas moléculas son menos sensibles a la luz, por lo que tras el mismo tiempo de irradiación no se aprecian variaciones significativas en el porcentaje de isómero **todo-*trans*** y por tanto los resultados no son comparativos con los obtenidos para el retinal y el ácido retinoico.

De forma análoga se realizaron las experiencias de fotoisomerización con el **ácido retinoico**, el cual al igual que el retinal es extremadamente sensible a la luz. En este caso, se logró su separación por HPLC en fase normal e inversa, aportando esta última una mayor resolución y permitiendo la visualización de isómeros tales como el **11,13-*dicis***, el

cual no se consigue separar cuando se emplea la fase normal. Hemos de señalar en este punto, que otros autores que emplean fase inversa identifican un mayor número de isómeros [1988 PP 831]. Este hecho puede deberse a que, a diferencia de nosotros, ellos no emplean filtro durante el proceso de irradiación, lo cual puede dar lugar a un mayor número de fotoproductos. Tanto en fase normal (FIGURA 186), como en fase inversa (FIGURA 187) y al igual que lo descrito para el retinal, el isómero mayoritario es el 13-*cis*.

Los resultados obtenidos en fase normal indican que al igual que en el caso del retinal, el proceso de fotoisomerización se produce en el seno de los medios acuosos micelares (FIGURA 188), seguido de los medios homogéneos. Son las ciclodextrinas (FIGURA 189) las que proporcionan una mayor protección, al obtenerse las menores reducciones en el porcentaje de isómero todo-*trans* tras la irradiación (TABLA XV).

Los resultados obtenidos tras la separación en fase inversa, demuestran que la mayor protección la proporcionan las ciclodextrinas, seguida de los medios micelares y es en etanol donde la fotoisomerización está más favorecida. Puesto que las condiciones de irradiación son siempre las mismas, la formación de isómeros también debe ser semejante independientemente de que para su separación se emplee fase inversa o fase normal. Por lo tanto, si los resultados difieren, es consecuencia del medio elegido para la separación.

La fase inversa, al proporcionar una mayor resolución, permite una cuantificación más adecuada, ya que es posible que en fase normal se obtenga un porcentaje de todo-*trans* retinal más elevado, debido a que algún isómero que no se separe quede, englobado en el pico correspondiente al isómero todo-*trans*. A la luz de estos resultados, parece que la fase inversa es la más apropiada para la cuantificación, y según esto, los medios organizados (ya sean micelas o ciclodextrinas) proporcionan mayor protección que los disolventes homogéneos (etanol), donde la molécula puede rotar libremente. No obstante, estos resultados han de enjuiciarse sólo para el caso que nos ocupa, donde es posible la separación en fase inversa y también con ciertas reservas ya que la variabilidad de los resultados es amplia.

A tenor de los resultados de la TABLA XVI, el Brij-35 presenta un comportamiento más parecido al etanol y la HP β -CD es la ciclodextrina que parece proteger mejor a la molécula, a diferencia de lo que sucede en fase normal, donde el Triton X-100 proporciona

una protección semejante a la del etanol, ya que los porcentajes de variación del isómero todo-*trans* son semejantes, mientras que el Brij-35 ofrece una protección semejante a la de las ciclodextrinas, tratándose sin embargo de dos tensoactivos no iónicos de características químicas muy semejantes.

Comportamientos dispares como lo descritos, también han sido puestos de manifiesto por otros autores [1988 JPPA 329] [1979 JC 113] para medios tales como SDS, estearato de butilo y fosfatidil colina, con el retinal, para separaciones realizadas en fase normal.

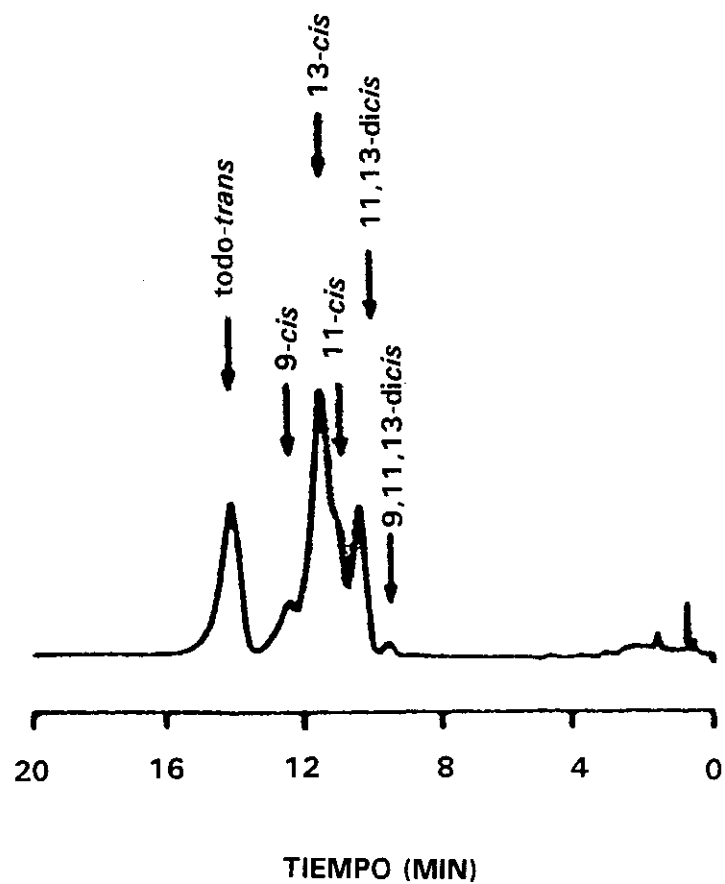


FIGURA 180: Cromatograma en fase inversa de los isómeros del ácido retinoico según Curley y col. (1988)[1988 PP 831].

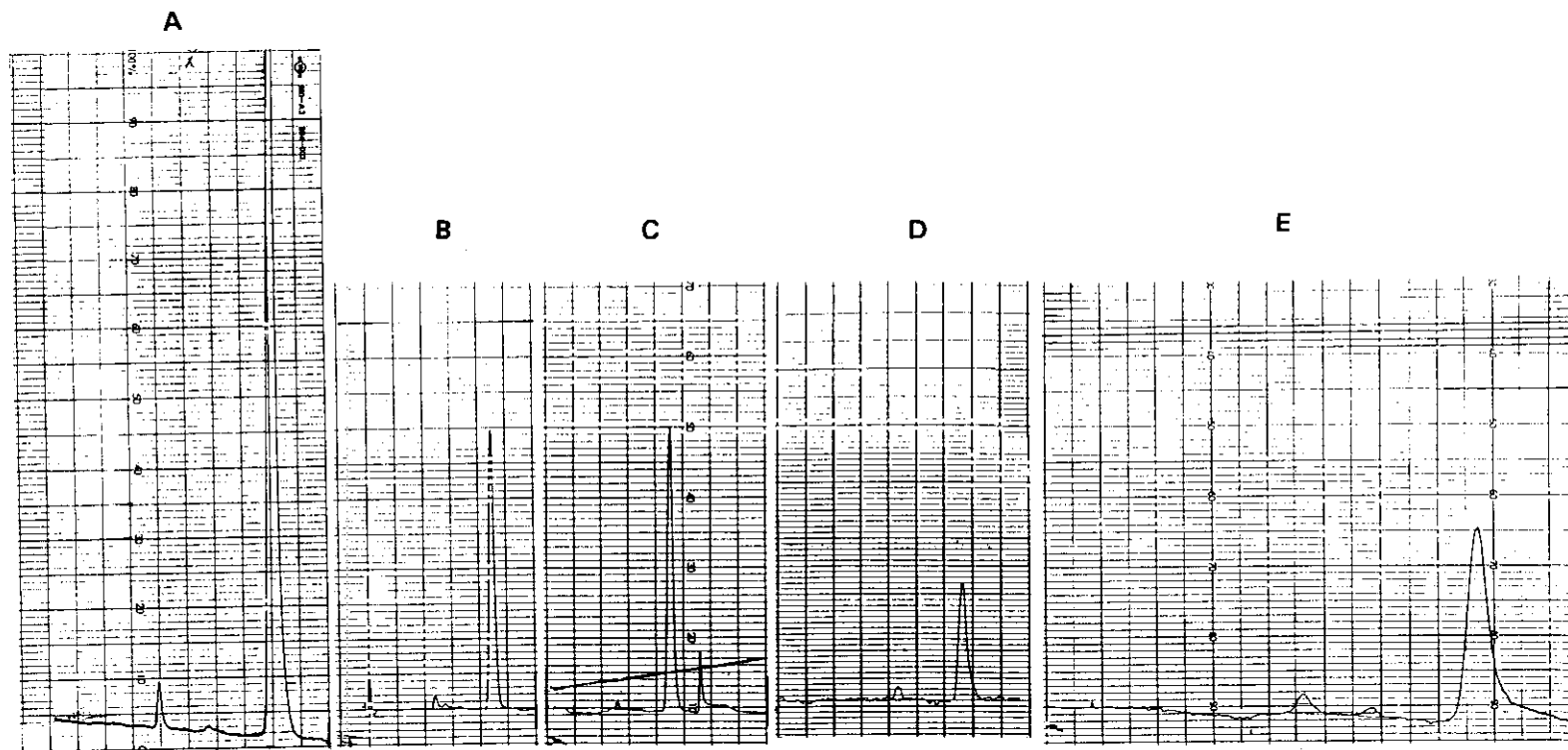


FIGURA 181: Cromatogramas obtenidos para soluciones recién preparadas de todo-trans retinal en: A) hexano, B) etanol, C) acetonitrilo, D) B-CD, E) Triton X-100 (fase normal).

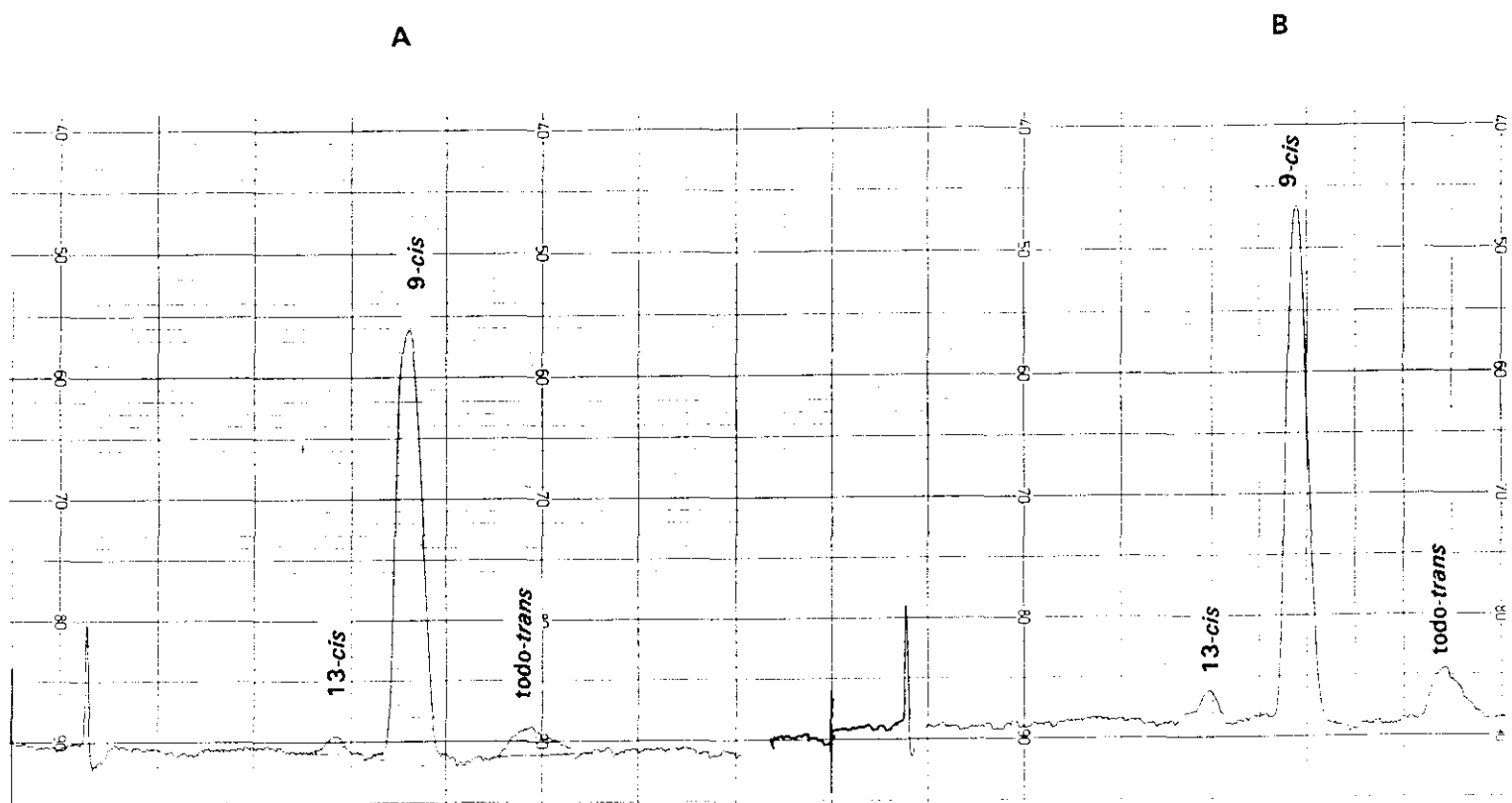


FIGURA 182: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución recién preparada de 9-cis retinal en etanol, (B) la misma solución transcurridos 90 minutos desde su preparación en la oscuridad (fase normal).

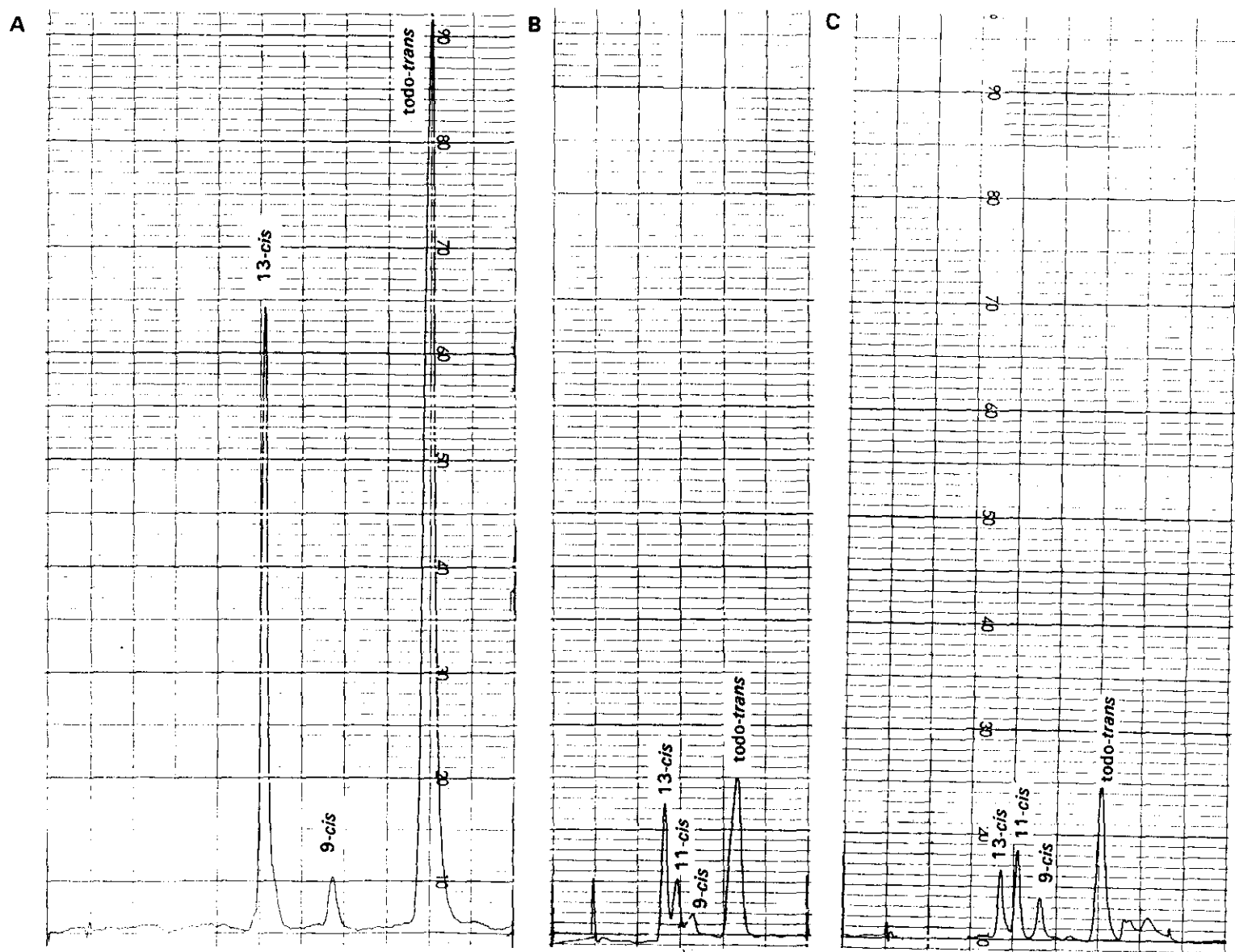


FIGURA 183: Cromatogramas obtenidos tras la irradiación del todo-trans retinal: (A) en hexano (t_i : 60 minutos), (B) en etanol (t_i : 35 minutos), (C) en acetonitrilo (t_i : 35 minutos), t_i : tiempo de irradiación (fase normal).

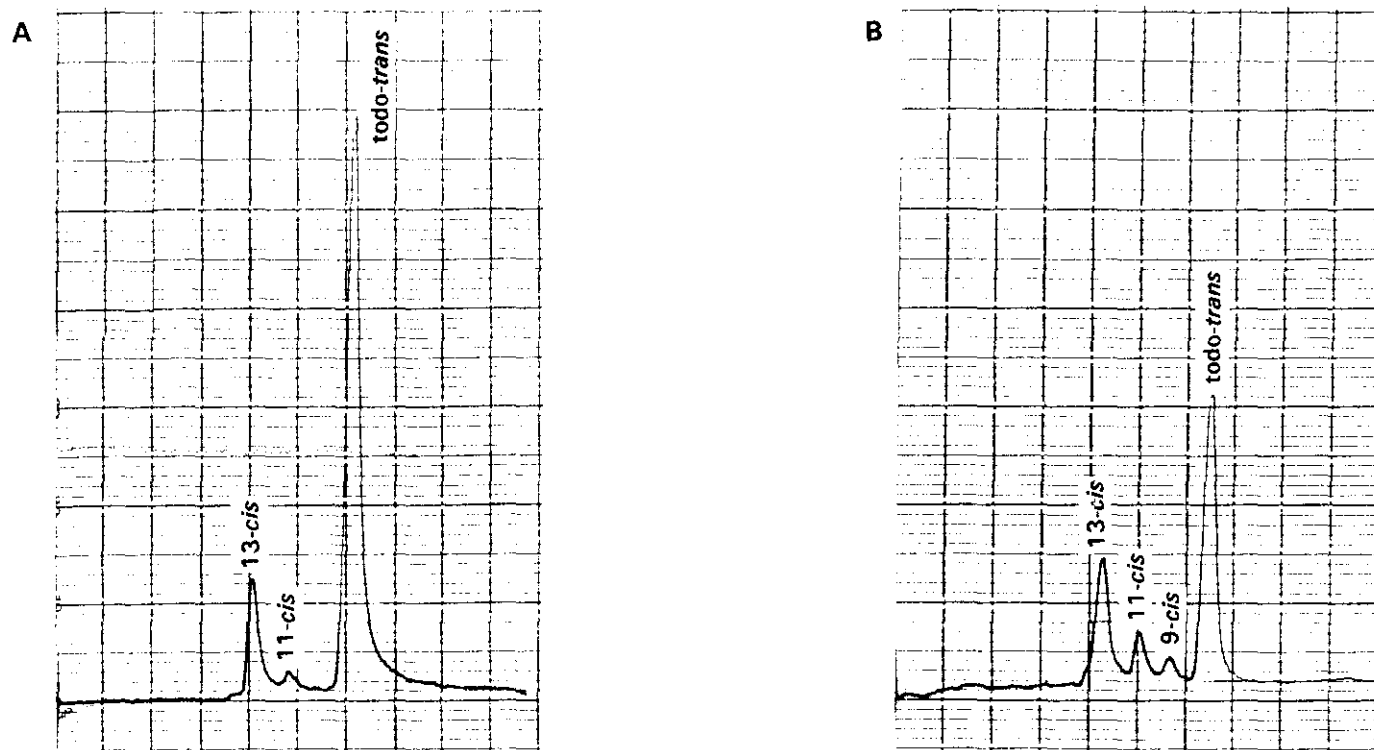


FIGURA 184: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución de todo-trans retinal/DM β -CD recién preparada, (B) después de 60 minutos de irradiación (fase normal).

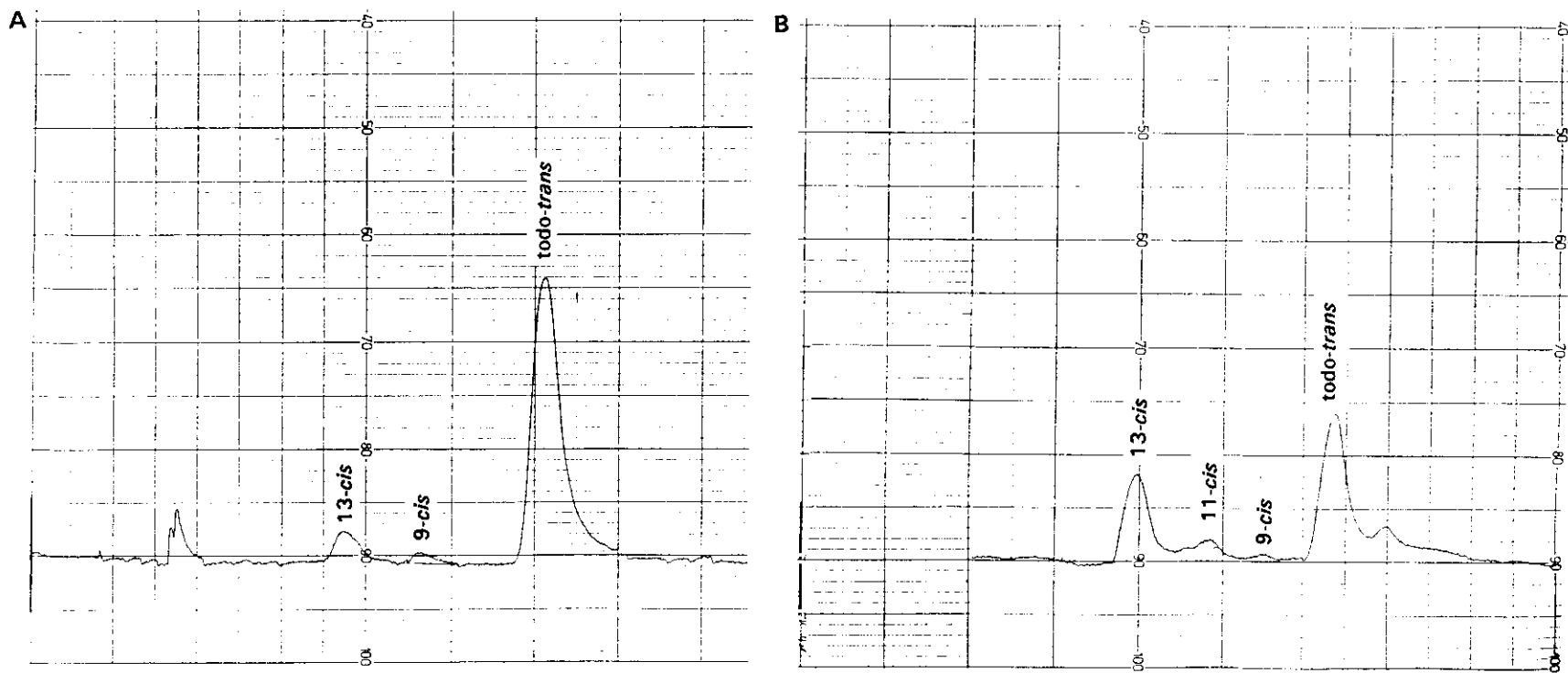


FIGURA 185: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución de todo-trans retinal/CTAB recién preparada, (B) después de 60 minutos de irradiación (fase normal).

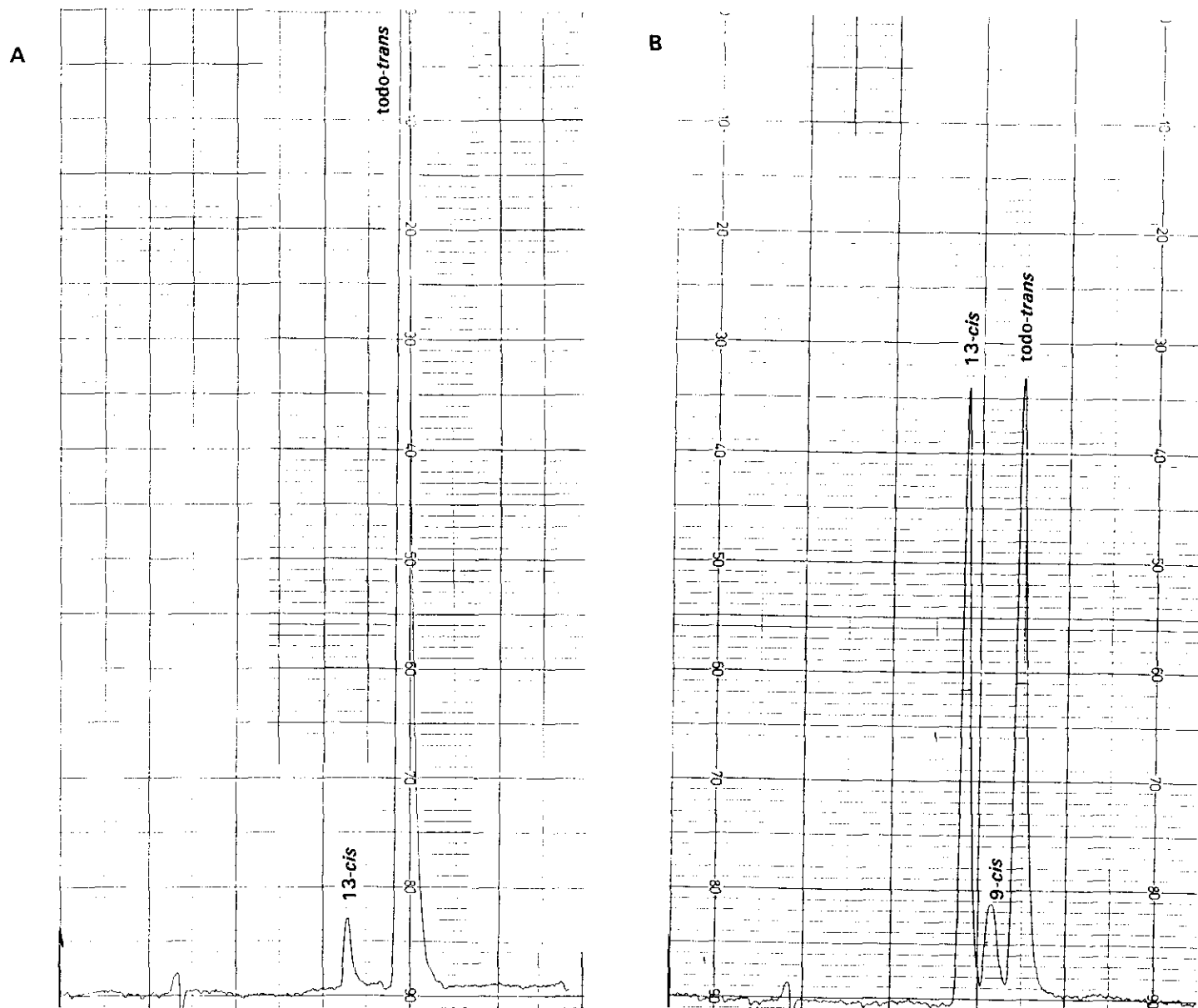


FIGURA 186: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución recién preparada de ácido retinoico en hexano, (B) después de 60 minutos de irradiación (fase normal).

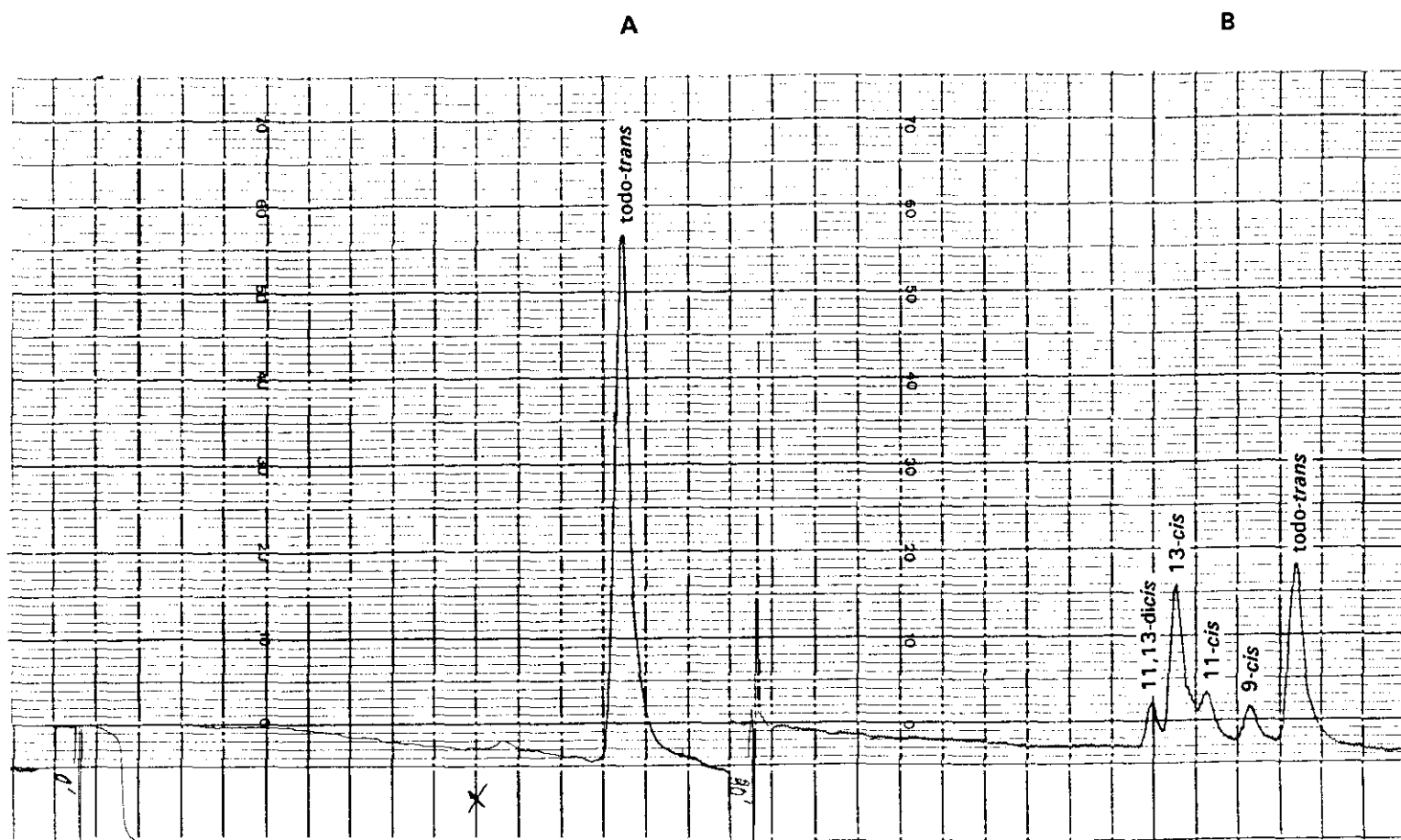


FIGURA 187: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución recién preparada de ácido retinoico en etanol, (B) después de 30 minutos de irradiación (fase inversa).

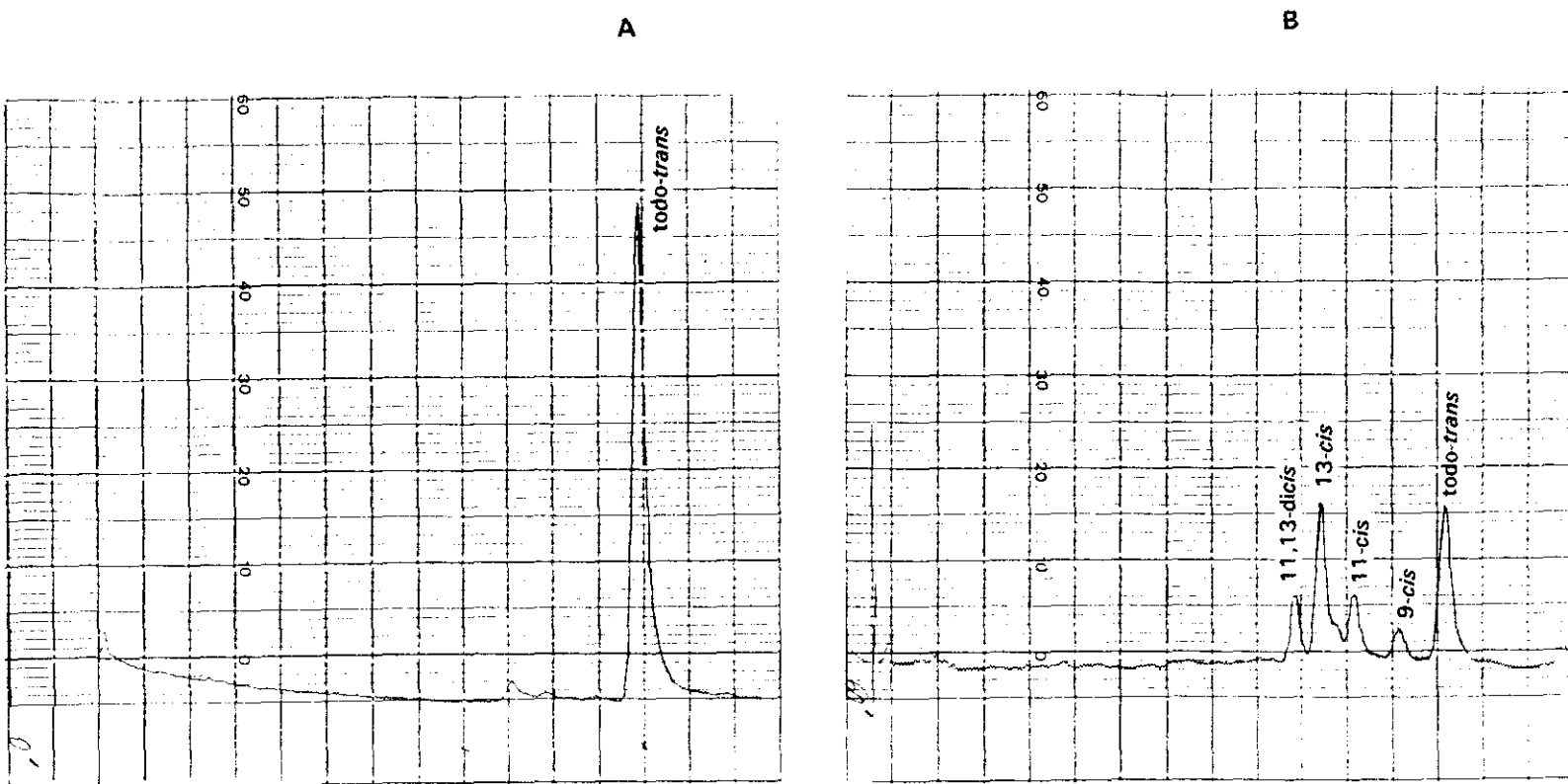


FIGURA 188: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución recién preparada de ácido retinoico/SDS, (B) después de 60 minutos de irradiación (fase inversa).

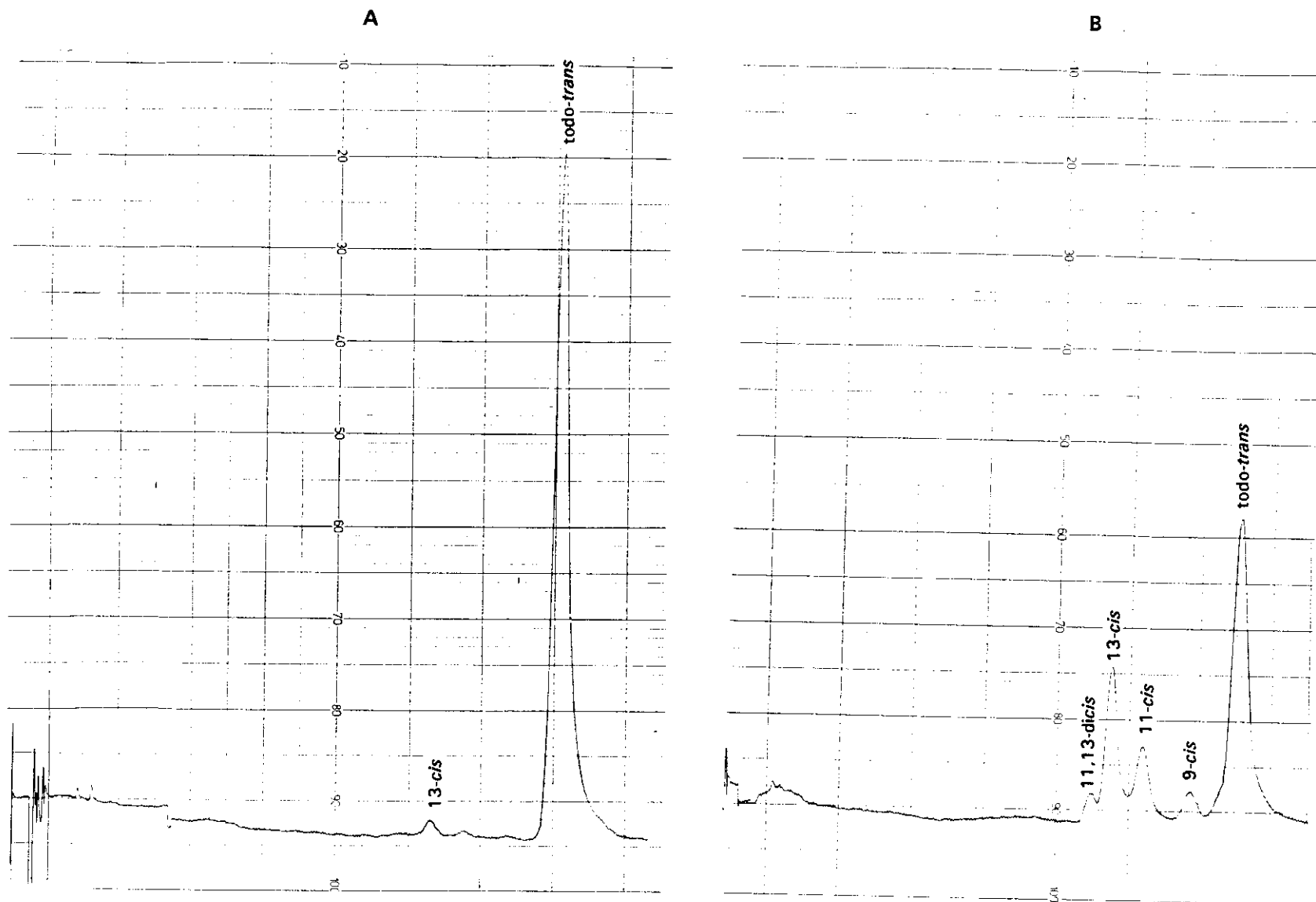


FIGURA 189: Cromatogramas obtenidos para: (A) una solución recién preparada de ácido retinoico/HP β -CD recién preparada, (B) después de 60 minutos de irradiación (fase inversa).

	$t_i = 0$ minutos				$t_i = 60$ minutos				% var
	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	
HEXANO	1'70			98'30	21'60		2'25	76'20	22'10
ETANOL	2'40	0'96	0'48	96'15	18'00	9'00	4'80	68'20	27'95
ACN	1'47	0'49	0'24	97'80	12'03	22'57	11'28	54'13	43'67
β -CD	10'50			89'50	23'50			76'50	13'00
DM β -CD	11'00	0'75		88'25	27'30	6'50	3'00	63'30	24'95
HP β -CD	21'60			78'40	21'90	2'20	5'80	70'10	8'30
SDS	12'89			87'11	31'88	1'00		67'12	19'99
CTAB	8'20		1'50	90'20	40'40	3'50	0'60	55'50	34'70
TX-100	6'00	2'60		91'40	33'40	3'80		62'80	28'60
BRIJ-35				100'00	35'20	7'30		57'50	42'50

TABLA XII: Porcentajes relativos de isomerización (%) del *todo-trans* retinal (fase normal), t_i = tiempo de irradiación, % var: variación en el porcentaje de isómero *todo-trans* antes y después de la irradiación.

	$t_i = 0$ minutos			$t_i = 60$ minutos			$t_i = 120$ minutos		
	13- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	13- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	13- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>
HEXANO	94'70		5'30	58'91	0'52	40'57	44'40	1'64	53'96
ETANOL	83'10		16'90	61'60		38'40			

TABLA XIII: Porcentajes relativos de isomerización (%) del 13-*cis* retinal (fase normal), t_i = tiempo de irradiación.

	$t_i = 0$ minutos			$t_i = 60$ minutos			
	13- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>
HEXANO	1'00	93'50	5'50	22'70		4'70	72'60
ETANOL	2'26	87'47	10'27	22'00	9'80	10'60	57'60

TABLA XIV: Porcentajes relativos de isomerización del 9-*cis* retinal (fase normal), t_i = tiempo de irradiación.

	$t_i = 0$ minutos				$t_i = 60$ minutos				% var
	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	
HEXANO	3'20			96'80	36'80		7'20	56'00	40'80
ETANOL	1'80			98'20	41'00			59'00	39'20
B-CD				100'00	30'40			69'60	30'40
DMB-CD	2'13	0'13		97'74	15'00	3'85	13'85	67'30	30'44
HPB-CD	2'40			97'60	41'35		8'00	50'50	47'10
SDS				100'00	57'14		2'52	40'43	59'66
CTAB				100'00	49'20		3'90	46'90	53'10
TX-100				100'00	48'65		0'90	50'45	49'55
BRIJ-35				100'00	26'15		1'50	72'35	27'65

TABLA XV: Porcentajes relativos de isomerización del **ácido retinoico** (fase normal), t_i = tiempo de irradiación , % var: variación en el porcentaje de isómero todo-*trans* antes y después de la irradiación.

	$t_i = 0$ minutos				$t_i = 60$ minutos					% var
	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	11,13- <i>dicis</i>	13- <i>cis</i>	11- <i>cis</i>	9- <i>cis</i>	<i>trans</i>	
ETANOL	5'50	1'40	1'40	91'70		45'02	15'43	7'72	31'83	59'87
B-CD	4'85			95'15	11'36	20'45	6'80	17'00	44'30	50'85
DMS-CD				100'00	4'10	17'40	14'30	9'50	54'60	45'40
HPB-CD	0'80	0'26		99'00	0'80	18'20	10'50	4'60	65'80	33'20
SDS	3'55	0'60		95'85	11'70	27'00	9'90	6'75	44'60	51'25
CTAB				100'00	3'35	37'40	2'70	4'00	52'50	47'50
TX-100	2'20			97'80	9'40	31'25	2'35	2'35	54'70	43'10
BRIJ-35	5'40			94'60	15'70	39'20	3'90		41'20	53'40

TABLA XVI: Porcentajes relativos de isomerización del **ácido retinoico** (fase inversa), t_i = tiempo de irradiación, % var: variación en el porcentaje de isómero todo-*trans* antes y después de la irradiación.

III.B.3.2 DETERMINACION CUANTITATIVA DE RETINOIDES POR FORMACION DE COMPLEJOS DE INCLUSION

Dado que la formación de complejos con ciclodextrinas conlleva una mejora en la sensibilidad de distintas técnicas analíticas [1992 CR 1457], y teniendo en cuenta que los derivados de retinoides son muy hidrófobos, pero que su determinación en soluciones acuosas posee un notable interés, se realizaron curvas de calibrado tras la preparación de complejos con ciclodextrinas a distintas concentraciones de retinoide. Para ello se consideró un intervalo de concentraciones comprendido entre 5×10^{-6} M y 5×10^{-5} M de retinoide, valores en los que habitualmente se encuentran estos productos en los alimentos y los organismos vivos [1986 L LVIII].

Se realizó un análisis espectrofotométrico UV-VIS de las soluciones acuosas y de las soluciones preparadas con ciclodextrinas, siguiendo el protocolo del trabajo descrito en el apartado III.A.2.4, midiéndose las absorbancias a las longitudes de onda de absorción correspondientes a cada complejo.

En las FIGURAS 190 a 196, se muestran los resultados obtenidos para los distintos complejos retinoide/CD, así como para las soluciones acuosas obtenidas a partir de soluciones etanólicas de los distintos retinoides.

En el caso de las soluciones acuosas (FIGURAS 190-193) el intervalo de concentraciones estudiado se hace descender hasta un valor de 1×10^{-6} M. Esto se debe a que debido a la metodología seguida (100 microlitros de solución etanólica que contiene el retinoide disuelto se completan hasta 10 mL con agua), a altas concentraciones de retinoide ($\approx 10^{-5}$ M) se produce opalescencia y las posibles desviaciones a la ley de Lambert-Beer tienen repercusiones claras en la linealidad.

De esta forma, se puede apreciar que para el retinal, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 1×10^{-5} M y 5×10^{-5} M (FIGURA 190A), la dispersión de los puntos es muy apreciable, por lo que el coeficiente de correlación es bajo, mientras que en el intervalo de 1×10^{-6} M a 5×10^{-6} M (FIGURA 190B), la dispersión de los puntos es mucho menor. En este caso, aunque no puede afirmarse que existe una muy buena

correlación lineal entre la absorbancia y la concentración de retinoide disuelto, el coeficiente de correlación asciende hasta un valor de 0'96.

Es indudable que para poder comparar los resultados obtenidos en solución acuosa y en presencia de ciclodextrinas, los retinoides deberían haber sido disueltos en agua, única y exclusivamente. Sin embargo, como los valores de las lecturas de la absorbancia en estas condiciones son aleatorios, se procedió a disolverlos en etanol, por lo que la lectura espectrofotométrica es la debida al retinoide disuelto en etanol, cuya polaridad se ve intensamente afectada por la presencia mayoritaria de agua (téngase en cuenta que la proporción en volumen es de un 1 % de etanol en agua). Aún en estos casos en los que los retinoides están disueltos gracias a la presencia del etanol y considerando el intervalo de concentraciones de los mismos donde las desviaciones en las lecturas son mínimas, se puede apreciar que para todos ellos la correlación lineal obtenida es baja ($r = 0'79-0'96$) y por tanto la determinación de estos compuestos en soluciones acuosas, aún en presencia de solventes orgánicos, presenta serias dificultades.

La correlación más baja se obtiene en el caso del ácido retinoico (FIGURA 191), que es la molécula más polar y que por tanto debería tener una mayor afinidad por el medio acuoso. Sin embargo, hemos de hacer dos consideraciones: la primera de ellas, es que por una parte, debido a su extremo polar y a su cadena hidrofóbica, el ácido retinoico puede tener un carácter anfifílico y mostrar cierto carácter tensoactivo, la segunda es que pueden producirse asociaciones entre estas moléculas, mediante la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, que dan lugar a la formación de dímeros, los cuales son más insolubles que los monómeros [1988 PP 369].

La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas, permite la cuantificación de los distintos derivados estudiados, con la excepción del retinol. Así pues, tanto el ácido retinoico como el acetato de retinilo y el retinal, presentan una buena correlación lineal, con coeficientes de correlación superiores a 0'99. En el caso del retinol, se ensayaron sin éxito la β -CD y la HP β -CD, no observándose en ningún caso correlación lineal y no pudiéndose por tanto lograr una cuantificación del mismo en presencia de ciclodextrina.

El comportamiento del retinol, con respecto a la formación de complejos con ciclodextrinas, es peculiar si se compara con sus análogos, ácido, aldehído y ester acético.

El retinol forma los complejos con ciclodextrina, como lo demuestran los resultados (absorción y fluorescencia) obtenidos a lo largo de esta memoria. Sin embargo, su comportamiento con respecto a la inclusión es extremadamente aleatorio: es decir, la inclusión se produce, pero no de forma repetitiva y regular. Así pues, el retinol presenta una estequiometría 1:1, pero es imposible el cálculo de la constante de asociación del complejo, debido a los datos tan dispersos que se obtienen. Además, aunque los espectros de absorción y de fluorescencia ponen de manifiesto la formación del complejo en numerosos ensayos, no se consiguen reproducir bien estos resultados. Este comportamiento podría explicarse si se tiene en cuenta que el retinol puede formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua debido a la presencia del grupo -OH. Esta solvatación hace que la molécula de retinol sea más hidrosoluble y que por tanto tenga menor tendencia a incluirse en la ciclodextrina, pudiendo quedar fijada únicamente sobre su superficie, tal y como se comentó anteriormente para el ácido retinoico y la HP β -CD.

A la vista de los resultados, parece ser que la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas, puede constituir una alternativa eficaz para la determinación de estos compuestos en medios acuosos, lo cual es de gran interés desde el punto de vista biológico. Los resultados, en el caso del acetato de retinilo, el ácido retinoico y el retinal así lo demuestran, ya que la regresión lineal es buena y la obtención de los complejos en estas condiciones experimentales es reproducible. Hemos de considerar que el método conlleva la cuantificación en soluciones acuosas pero como desventaja implica una metodología tediosa (24 horas para la preparación del complejo) lo cual disminuye la versatilidad del método propuesto. Sin embargo, la determinación de estos compuestos en medios orgánicos va acompañada de laboriosos procedimientos de extracción, con las consiguientes pérdidas de analito, consumo de tiempo y disolventes, por lo que desde nuestro punto de vista la formación de complejos con ciclodextrinas puede constituir una alternativa valiosa para la determinación de los mismos.

Para finalizar este apartado, compararemos las pendientes de las rectas de calibrado, obtenidas en soluciones acuosas que contienen el retinoide disuelto en etanol y las obtenidas para los complejos con ciclodextrinas. En el caso de los complejos de inclusión, las pendientes son ligeramente más altas para el acetato de retinilo y el ácido retinoico, o aún mayores en el caso del retinal en el mismo intervalo de concentraciones. No obstante, los valores numéricos no son completamente comparables puesto que las

soluciones acuosas llevan incorporado etanol y el intervalo de concentraciones elegido es ligeramente distinto.

De todo lo expuesto se deduce que la formación del complejo de inclusión permite la determinación analítica de estos compuestos en soluciones acuosas con un buen intervalo de linealidad, a la vez que mejora la sensibilidad salvo, en el caso del retinol.

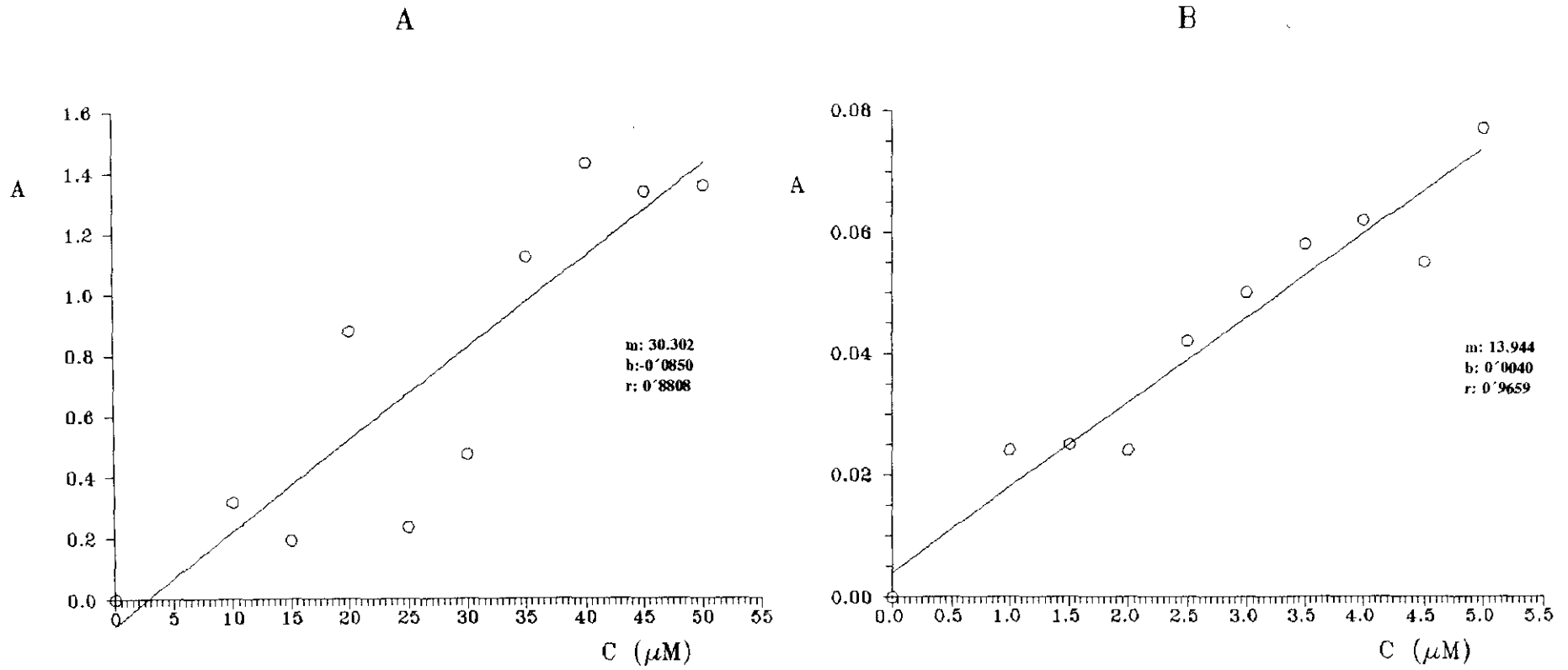


FIGURA 190: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de retinal en agua, para distintas concentraciones de retinal. A: absorbancia, C: concentración (μM).

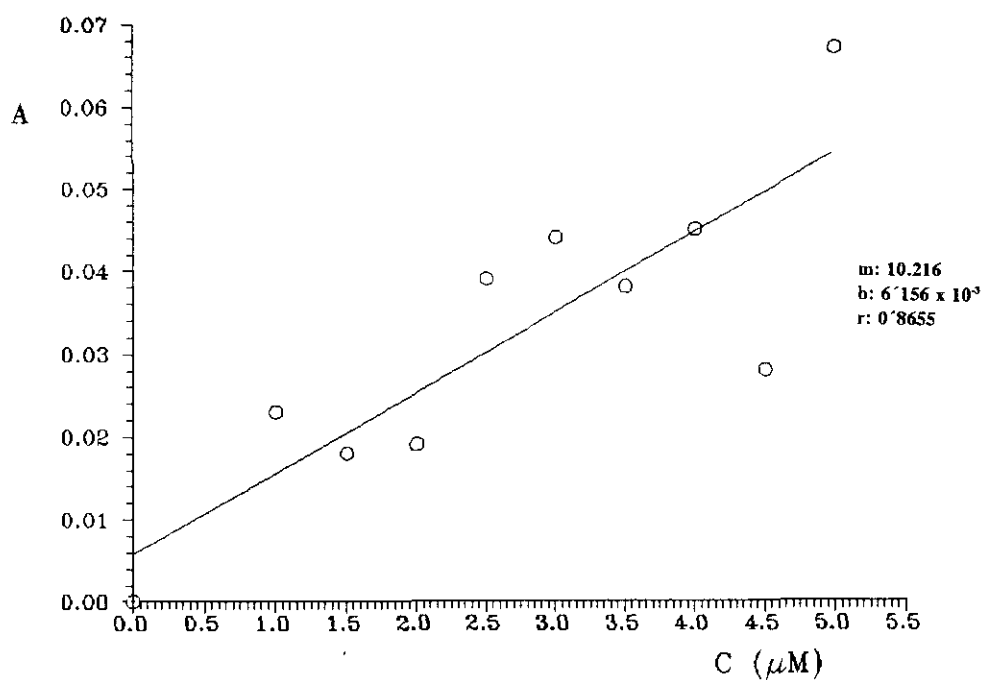


FIGURA 191: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de acetato de retinilo en agua. A: absorbancia, C: concentración (μM).

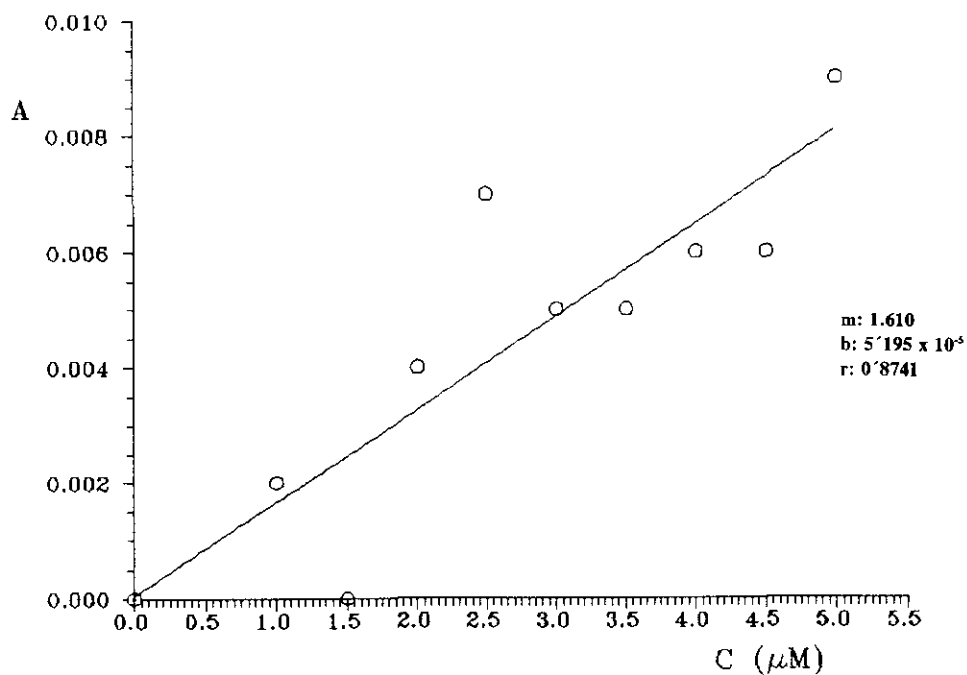


FIGURA 192: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de retinol en agua. A: absorbancia, C: concentración (μM).

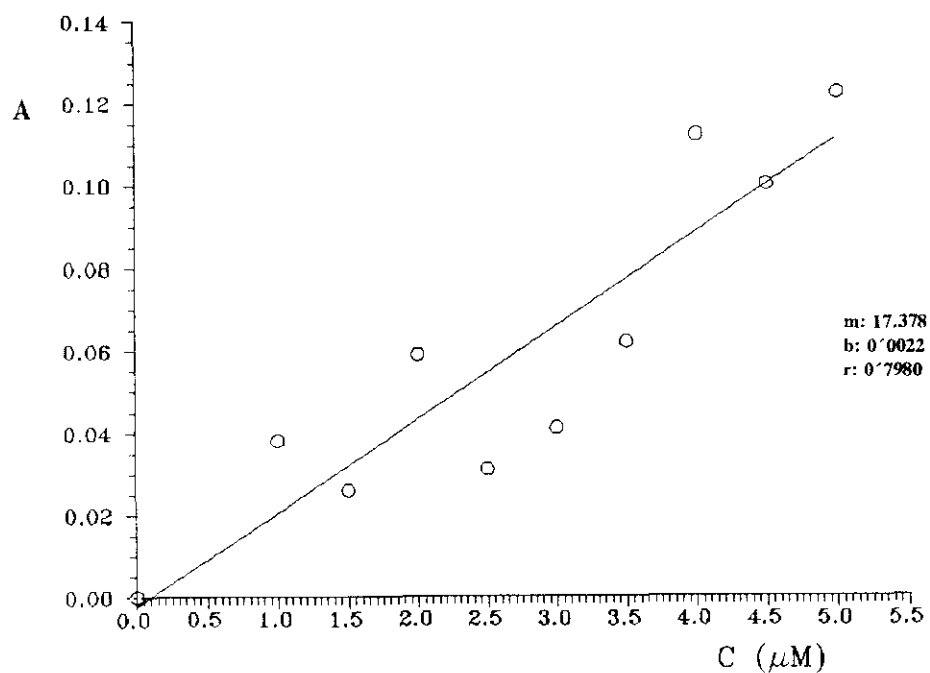


FIGURA 193: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de ácido retinoico en agua. A: absorbancia, C: concentración (μM).

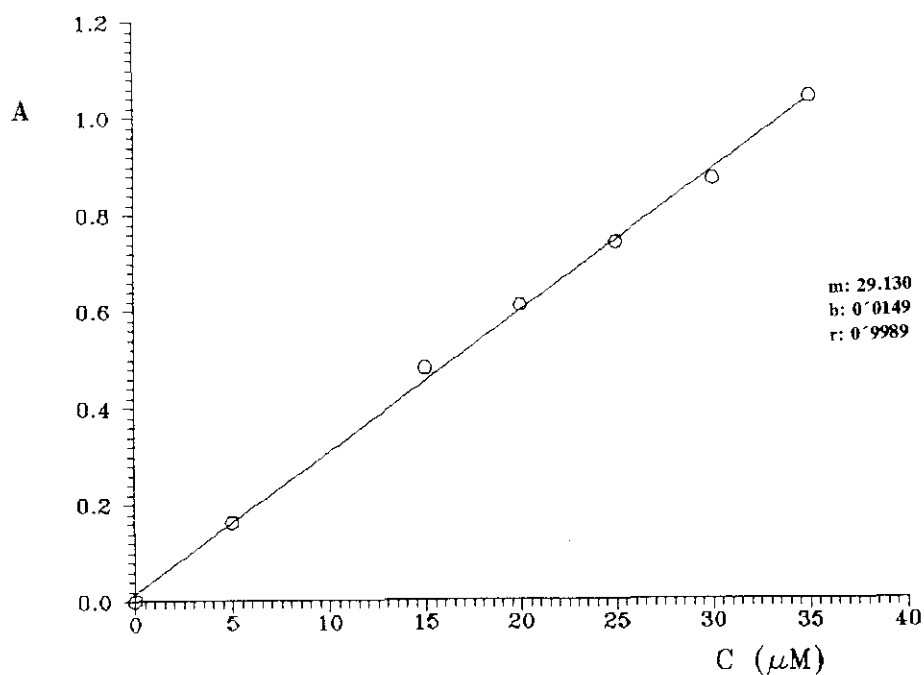


FIGURA 194: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de retinal mediante la formación de un complejo de inclusión hidrosoluble con β -CD. A: absorbancia, C: concentración (μM).

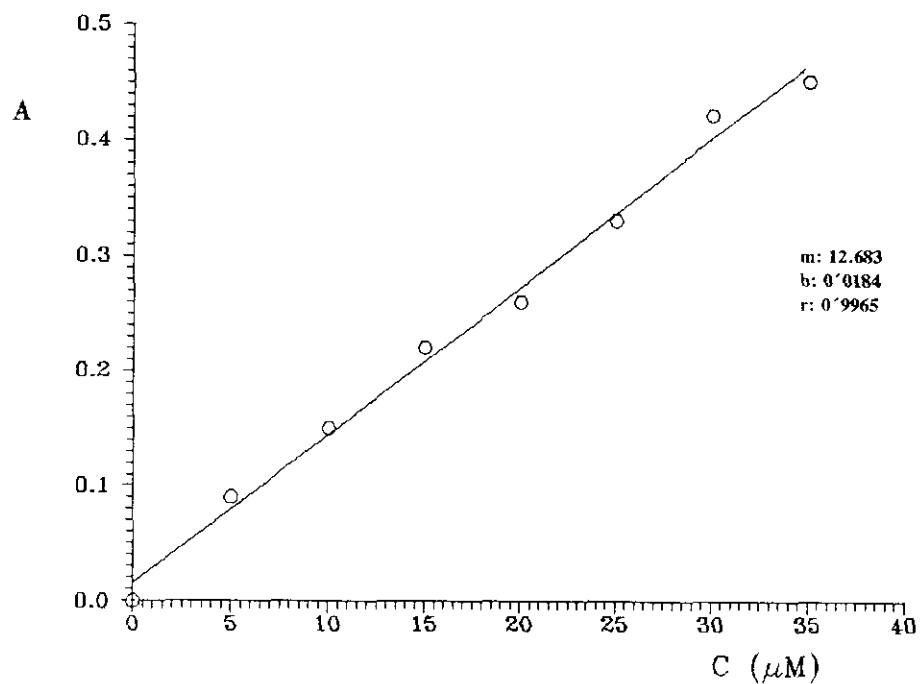


FIGURA 195: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de acetato de retinilo mediante la formación de un complejo de inclusión hidrosoluble con H β -CD. A: absorbancia, C: concentración (μ M).

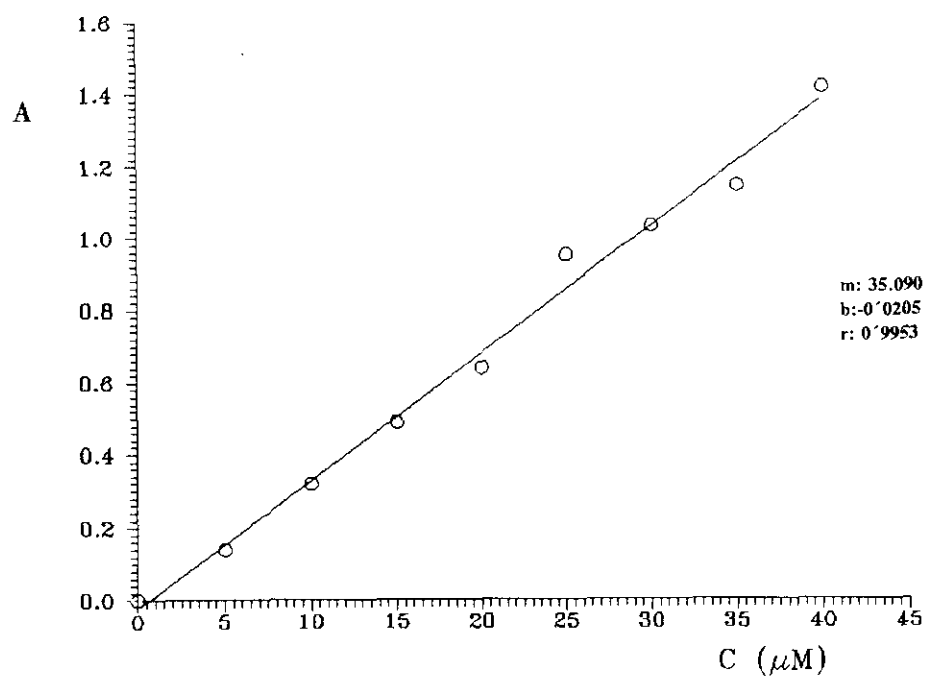


FIGURA 196: Curva de calibrado y parámetros de regresión lineal obtenidos en la determinación cuantitativa de ácido retinoico mediante la formación de un complejo de inclusión hidrosoluble con β -CD. A: absorbancia, C: concentración (μ M).

IV.DISCUSION FINAL

IV. DISCUSION FINAL

Según se desprende de los resultados obtenidos por espectrofotometría de absorción UV-VIS, espectrofluorimetría, ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, espectrofotometría de absorción IR y métodos térmicos podemos afirmar que los retinoides objeto de la presente memoria forman complejos de inclusión con distintos tipos de ciclodextrinas.

Un trabajo preliminar [1989 ACA 297], en el que se describe la formación de complejos de inclusión entre el retinal y distintas ciclodextrinas, fue el punto de partida para el desarrollo de la formación de complejos de inclusión con otros retinoides, al mismo tiempo que se decidió ampliar el campo de estudio con otras ciclodextrinas, así como a otras técnicas instrumentales. En este trabajo se pone de manifiesto que la formación de complejos de inclusión entre el retinal y las ciclodextrinas permite observar a temperatura ambiente la luminiscencia de una molécula, el retinal, que no fluoresce a temperatura ambiente en soluciones homogéneas. Los rendimientos cuánticos obtenidos para estos complejos fueron entre uno y dos órdenes de magnitud superiores a los que se obtienen en soluciones homogéneas.

Una de la técnicas más utilizadas en la detección de complejos de inclusión con ciclodextrinas es la espectrofotometría de absorción UV-VIS. Dado que los retinoides son prácticamente insolubles en agua, la formación de complejos de inclusión con las distintas ciclodextrinas se pone de manifiesto por la aparición de las bandas de absorción características de estas moléculas en la región UV-VIS. No obstante, estos datos han de evaluarse a la luz de los resultados obtenidos mediante otras técnicas instrumentales, ya que si bien para la mayoría de los autores la espectrofotometría de absorción UV-VIS puede ser una prueba definitiva de la formación de complejos de inclusión, hemos de tener en cuenta que se puede producir la solubilización de las moléculas de retinoide, por acción de las ciclodextrinas presentes en la solución, sin que se haya producido un verdadero proceso de inclusión. En este caso obtendríamos igualmente un espectro de absorción UV-VIS de características semejantes a las del retinoide disuelto en solventes orgánicos.

Para otros autores, la justificación de la formación del complejo es que, además de lo anteriormente mencionado, se produzcan desplazamientos de los máximos de absorción con respecto a los que se observan en disolventes orgánicos. En nuestro caso se aprecian

desplazamientos batocrómicos de dichos máximos de absorción, aunque pensamos que estos saltos pueden atribuirse también a efectos de la variación de la polaridad del disolvente. Por otra parte, si se producen desplazamientos de los máximos de absorción como consecuencia de la variación de la polaridad del entorno, el hecho de que en las soluciones de los complejos de retinoide/CD se obtengan unos máximos de absorción similares que los que se obtienen en disolventes orgánicos (retinal en agua: $\lambda_{\max} = 366 \text{ nm}$, retinal en etanol: $\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$, retinal/ β -CD: $\lambda_{\max} = 380 \text{ nm}$) constituye una prueba de que las moléculas de retinoide se hallan en un entorno de polaridad inferior al agua y muy semejante a la del etanol.

Los datos espectrofotométricos permitieron estudiar la evolución de los complejos de inclusión con el tiempo, y demuestran que una vez formado el complejo, la absorbancia no varía durante periodos de tiempo relativamente largos. Por tanto, estas moléculas lábiles son estables como resultado de la protección que aporta la cavidad de las ciclodextrinas.

Con todos estos resultados decidimos emplear otras técnicas instrumentales para poner de manifiesto la formación del complejo. La espectrofluorimetría es muy versátil al igual que la espectrofotometría de absorción UV-VIS. Sin embargo, alguno de los retinoides objeto de estudio presentan la característica de no ser luminiscentes a temperatura ambiente. Dado que en los últimos años las ciclodextrinas, al igual que las micelas, se han empleado como sistemas que permiten observar fosforescencia a temperatura ambiente, la formación de complejos de inclusión retinoides/ciclodextrinas debe permitir observar luminiscencia para aquellas moléculas que no lo sean, o bien un incremento en la fluorescencia nativa de aquellas que lo son. En nuestro caso, se observó luminiscencia para todos los retinoides estudiados y su intensidad varió mucho, dependiendo de la ciclodextrina empleada en la experiencia.

Centrándonos entonces en el todo-*trans* retinal, que es una molécula que no es fluorescente a temperatura ambiente, a diferencia del acetato de retinilo y el retinol que presentan fluorescencia en disolventes orgánicos, se observa emisión fluorescente con todas las ciclodextrinas estudiadas. Las intensidades de fluorescencia detectadas son más altas para los complejos de retinal/ β -CD y retinal/HP β -CD. Las intensidades más bajas se obtienen, por regla general, en el caso de la α -CD y la TM β -CD. Cabe esperar que en los casos de la β -CD y la HP β -CD se produzca la inclusión a través del anillo de ciclohexeno,

que es el extremo apolar de la molécula y que además se ajusta mejor a las dimensiones de la cavidad de la β -CD, como se puede apreciar en la FIGURA 197 donde los cálculos matemáticos sobre modelos moleculares muestran que la inclusión está favorecida para el anillo de ciclohexeno. Cuando en el espectro de absorción UV-VIS de los complejos de retinal con β -CD e HP β -CD, aparecen unos pequeños picos que se correlacionan con las posiciones de los picos que aparecen en el espectro de excitación fluorescente de los complejos de retinal con la β -CD y la HP β -CD, la fluorescencia obtenida es más intensa y este hecho puede atribuirse a que la acomodación de la molécula de retinal en la cavidad de la ciclodextrina es la más ajustada y constreñida debido a sus características geométricas. Este hecho sólo se observó en el caso complejos formados entre estas dos ciclodextrinas con el retinal y con el acetato de retinilo.

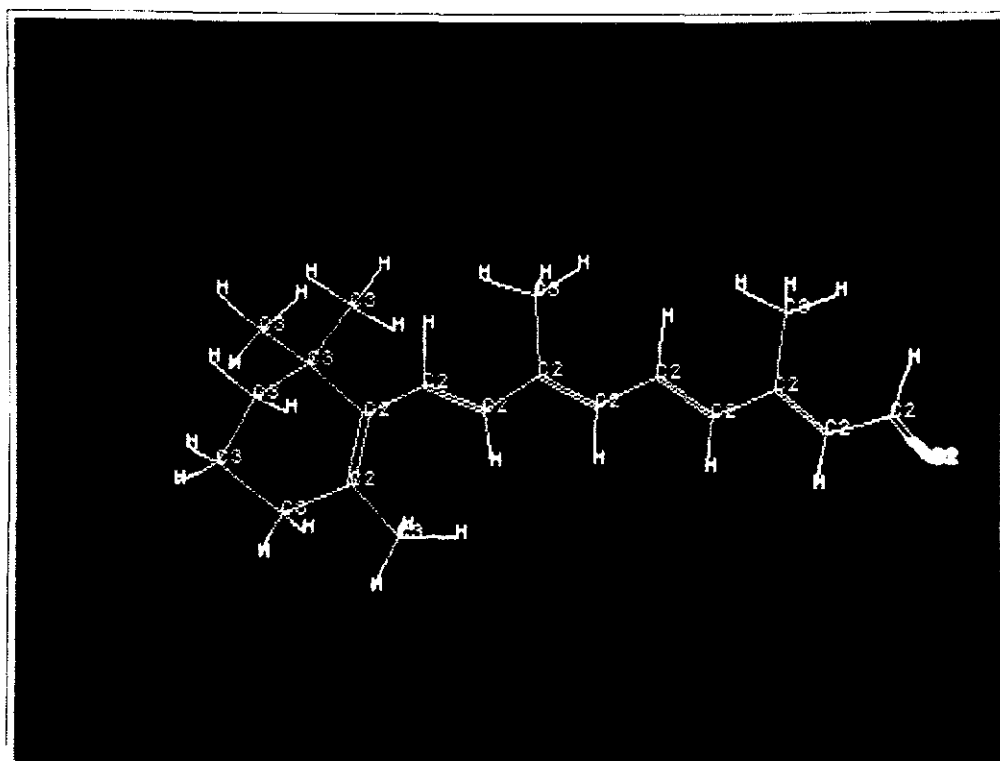
Los valores tan bajos de intensidad de fluorescencia que se obtienen para los complejos con TM β -CD y α -CD podrían explicarse si se considera que los retinoides entran en la TM β -CD, al igual que en la α -CD, por el extremo polar de la cadena, quedando incluida una parte de la misma. Esto ocurriría así, porque la cadena es más estrecha que el anillo y puede salvar el impedimento estérico que crean los sustituyentes metílicos sobre los -OH secundarios en el caso de la TM β -CD y la menor dimensión de la cavidad de la α -CD. En el caso de los retinoides de disposición *todo-trans* (FIGURA 198), la facilidad para que la cadena entre, sería equivalente a su capacidad de salida y por tanto el resultado final sería que la fracción de moléculas incluidas o solubilizadas es pequeña, por lo que el *espectro de absorción UV-VIS no muestra la banda característica del compuesto solubilizado*. El comportamiento del 9-*cis* retinal con respecto a la inclusión, difiere apreciablemente del resto de los retinoides, debiéndose probablemente a su disposición espacial (FIGURA 199). Así esta molécula penetraría igualmente por el extremo polar junto con parte de la cadena, quedando incluida de forma estable, gracias a las interacciones surgidas entre el anillo de ciclohexeno y la superficie externa de la ciclodextrina (FIGURA 71).

Para el isómero 13-*cis*, el comportamiento con respecto a la inclusión es más parecido al del isómero *todo-trans* que al del isómero 9-*cis*, lo cual puede explicarse teniendo presente su disposición espacial (FIGURA 200).



FIGURA 197: Modelos moleculares que predicen el modo de inclusión del retinol en la B-CD.

A



B

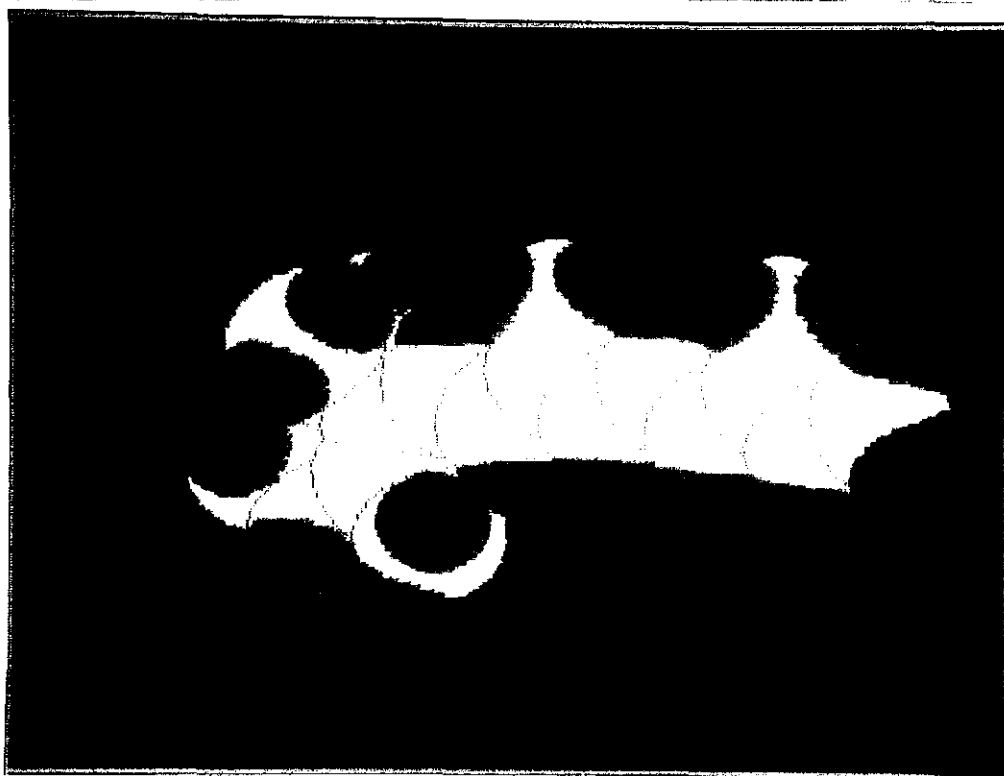
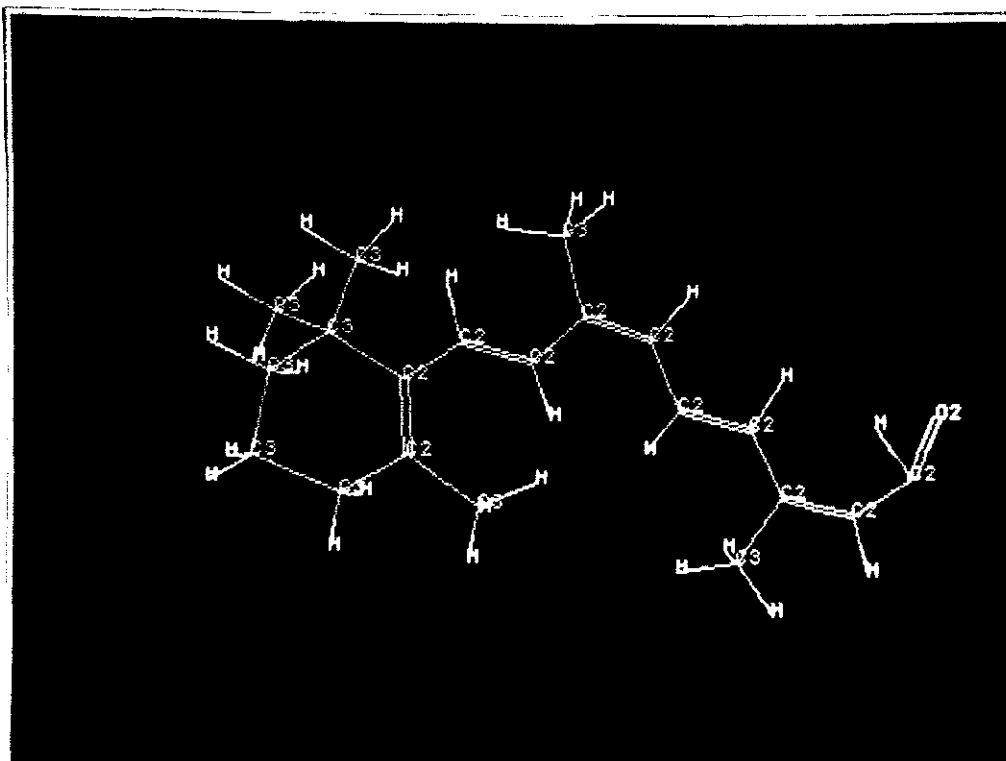


FIGURA 198: Modelo molecular del todo-trans retinal: (A) disposición espacial (B) considerando los radios de Van der Waals.

A



B

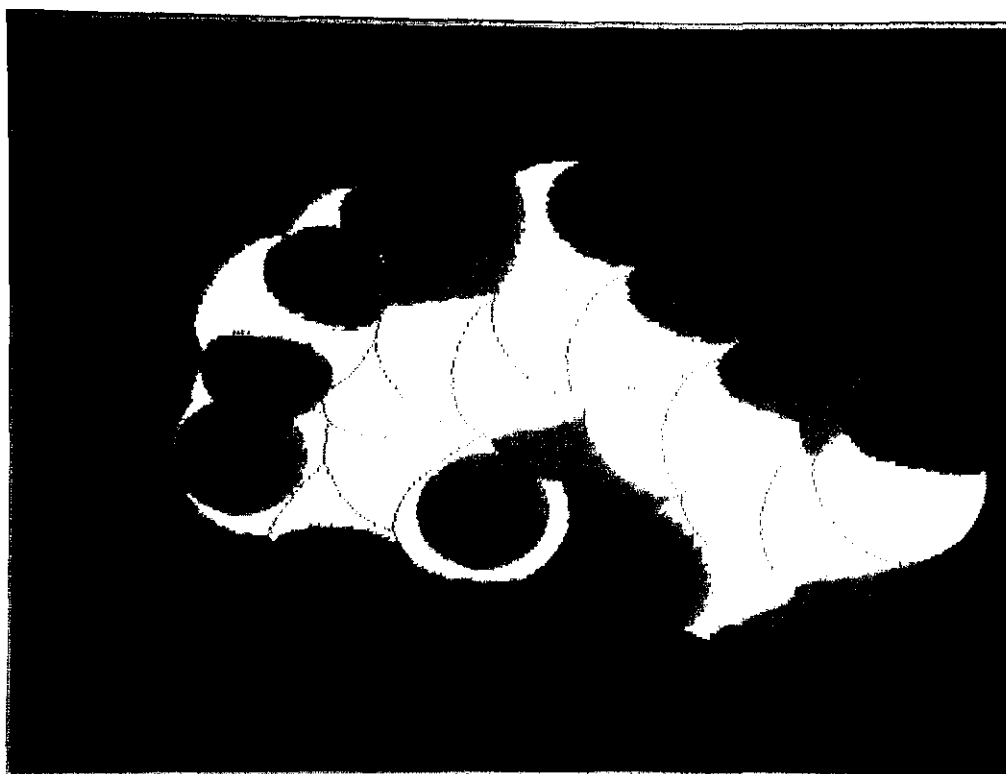
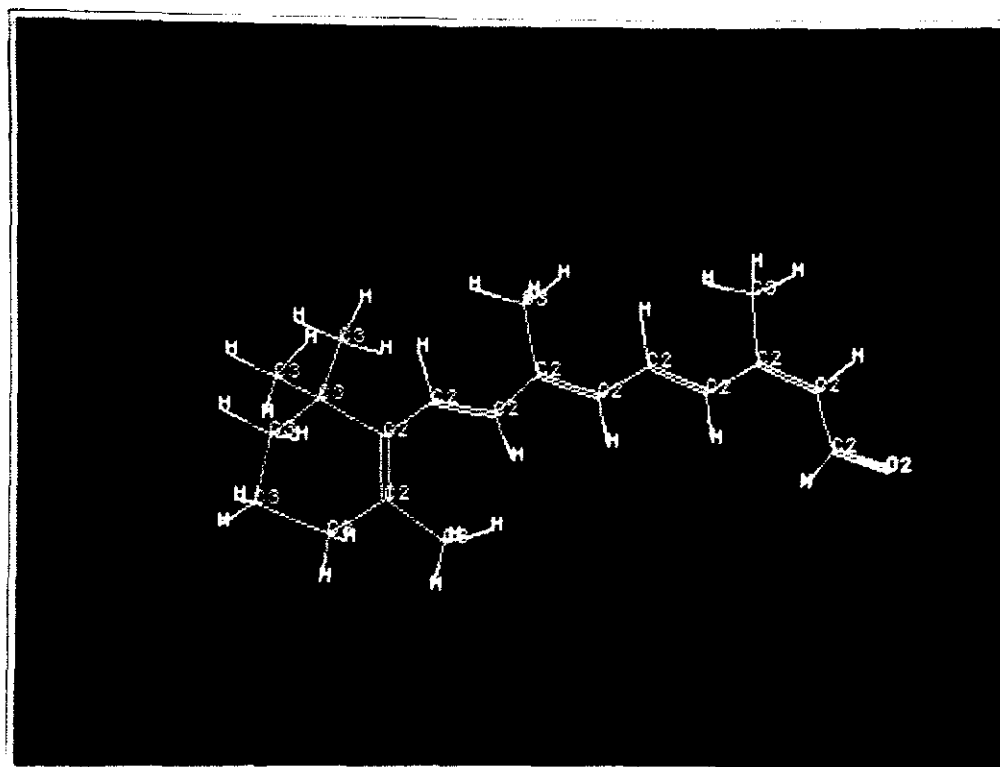


FIGURA 199: Modelo molecular del 9-cis retinal: (A) disposición espacial (B) considerando los radios de Van der Waals.

A



B

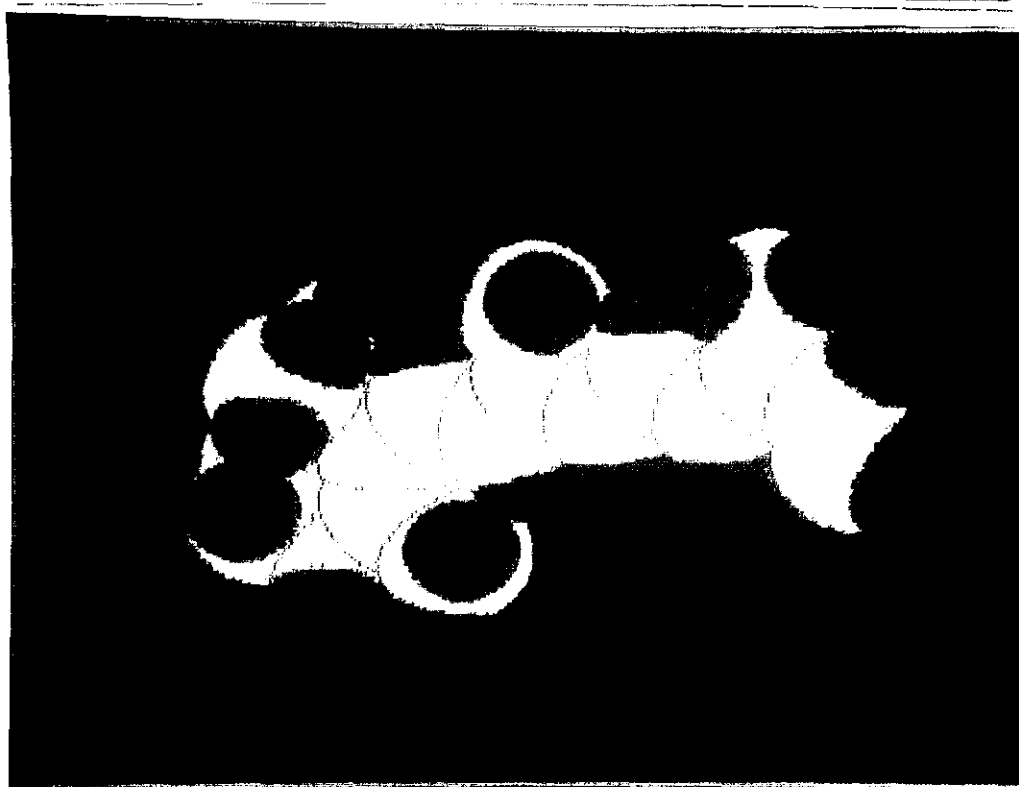


FIGURA 200: Modelo molecular del 13-cis retinal: (A) disposición espacial (B) considerando los radios de Van der Waals.

Los espectros de absorción UV-VIS muestran en el caso de la γ -CD, que se produce una buena solubilización de los distintos retinoides. Sin embargo, debido al mayor tamaño de su cavidad, si se compara con la β -CD, las moléculas de retinoide gozan de libertad para entrar y salir de la misma y al mismo tiempo para rotar libremente en el interior de la cavidad, lo que explicaría la disminución en las señales de fluorescencia observadas en los complejos de γ -CD.

En el caso del acetato de retinilo que presenta una débil fluorescencia nativa y por tanto se pueden apreciar mejor los desplazamientos originados como consecuencia del proceso de inclusión; se observa una mayor resolución en los espectros de excitación y de emisión fluorescente al formarse los complejos de inclusión y además se obtienen máximos de emisión diferentes según la ciclodextrina empleada.

Al igual que las ciclodextrinas, los medios micelares se han utilizado desde el punto de vista analítico para mejorar las determinaciones cuantitativas de moléculas orgánicas por espectrofluorimetría. Ello se debe a que se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia como consecuencia de la protección del estado excitado de la molécula del medio acuoso externo y de los posibles "quenchers" que en él se encuentran.

Por otra parte, es bien conocido que los tensoactivos actúan como agentes solubilizantes de moléculas hidrófobas. Por tanto, teniendo en cuenta las características de polaridad de los retinoides y considerando la fácil desactivación del estado excitado en aquellos retinoides que son fluorescentes, se llevó a cabo el estudio de la influencia de los medios micelares (aniónicos, catiónicos y no iónicos) sobre la luminiscencia de estos compuestos. Por todo ello, se comparó la luminiscencia de los complejos de inclusión con CD con la obtenida en el seno de medios micelares.

La presencia de los tensoactivos seleccionados permitió observar la fluorescencia de los distintos retinoides estudiados. Con algunos tensoactivos y para algunos retinoides (retinal) la intensidad de fluorescencia fue muy similar a la observada en el caso de la β -CD y la HP β -CD. Este hecho puede atribuirse a la protección del estado excitado que proporcionan las micelas, así como a la buena solubilización que se produce para unas moléculas tan hidrofóbicas. A pesar de esta buena solubilización, con otros retinoides (ácido retinoico) no se obtuvo una notable intensidad de fluorescencia, lo cual puede

atribuirse al hecho de que las micelas son un sistema dinámico y de igual forma que la solubilización de los retinoides se produce más fácilmente que en el caso de las ciclodextrinas, la salida de las moléculas de la fase apolar de las micelas es también más sencilla.

Del estudio de los espectros de absorción IR se constatan modificaciones en el perfil espectral, como consecuencia del proceso de inclusión del retinal en la ciclodextrina. Estos desplazamientos son especialmente marcados para la banda del carbonilo, característica del retinal. Se observa un desplazamiento muy claro de esta banda para el complejo si se compara con el retinal puro y un menor desplazamiento para la mezcla física retinal/ β -CD con respecto al retinal.

Aunque la espectroscopia de absorción IR no es la técnica ideal para el estudio este tipo de complejos, debido a que las alteraciones espectrales quedan ocultas por la presencia mayoritaria de moléculas de ciclodextrina, algunos autores se basan en las pequeñas modificaciones observadas en el espectro IR del complejo, para proponer la existencia de un complejo de inclusión para la β -CD y ciertos antiinflamatorios, tales como la indometacina y el ácido flufenámico donde la banda del carbonilo se desplaza a frecuencias más bajas o desaparece debido al ensanchamiento de la banda.

Igualmente hemos de considerar que el desplazamiento observado en la banda del carbonilo, para la mezcla física retinal/ β -CD, puede ser la suma de dos posibles fenómenos. Primero, si consideramos que al preparar el comprimido de KBr de la mezcla física retinal/ β -CD, para obtener el espectro IR, hemos de aplicar con el pistilo una energía que puede ser suficiente como para que una pequeña fracción de moléculas de retinal se incluya en la β -CD (de forma semejante a lo descrito en la metodología en la preparación del complejo sólido). Segundo debido a que la presencia de la ciclodextrina modifica el perfil espectral por "efecto de la concentración".

En el caso del complejo aislado, el desplazamiento de la banda del carbonilo es lo suficientemente significativo como para suponer la existencia de un complejo de inclusión, reflejándolo así numerosos trabajos de la bibliografía consultada. No obstante decidimos continuar la caracterización del complejo de inclusión aislado mediante otras técnicas que proporcionen mayor información sobre el proceso de inclusión.

Como se ha comentado en el apartado II.B.3.3.7.3.4.4., la ^1H -RMN es una técnica muy valiosa en el estudio de complejos de inclusión con ciclodextrinas, dado que la inclusión de la molécula huésped altera los valores de desplazamiento químico de los protones de la CD orientados hacia el interior de la cavidad (H_3 y H_5). Los espectros de ^1H -RMN de los distintos complejos estudiados en D_2O , ponen de manifiesto la existencia de un complejo de inclusión mediante las modificaciones que se observan en el perfil espectral, así como por las variaciones en el valor de δ para los distintos protones. Así pues, se producen $\Delta\delta$ de 0'01 ppm para el protón H_5 orientado hacia el interior de la cavidad. En el caso de las señales correspondientes al H_3 , se produce un $\Delta\delta$ de 0'04 ppm (TABLA V). Sin embargo esta variación ha de considerarse con ciertas reservas ya que los valores correspondientes a los protones H_3 aparecen enmascarados por otras señales. En cualquier caso, la variación en el valor de δ de los protones orientados hacia el interior de la cavidad constituye una prueba de que la molécula huésped se ha alojado en el interior de la CD. Estos desplazamientos se observan de forma aún más marcada en el caso del complejo aislado y disuelto en DMSO.

Dado que la modificación más importante y que es perceptible en nuestras condiciones experimentales se produce para el protón H_5 en el caso del complejo aislado, podemos intuir que el retinal se encuentra alojado en el interior de la cavidad de la CD. Es muy probable que se produzcan modificaciones similares para el H_3 pero en nuestras condiciones experimentales no pudieron detectarse, debido a que queda solapado con otras señales. No obstante este hecho constituye una prueba inequívoca de la formación del complejo de inclusión. Además, se modifica de forma notable el valor de la constante de acoplamiento, pasando de un valor $J = 12'34$ Hz para la solución de β -CD pura a un valor de $J = 5'62$ Hz para el complejo retinal/ β -CD. El hecho de que la inclusión afecte al valor de J implica que la estructura del anillo de ciclodextrina se deforma, como consecuencia del proceso de inclusión. Los resultados anteriores se confirman por los datos obtenidos por ^{13}C -RMN, donde si bien las variaciones numéricas del valor de δ son mayores, resultan ser del mismo orden que las observadas para ^1H -RMN, considerando que la amplitud de las escalas de ambos registros espectrales.

Los resultados obtenidos del estudio por termogravimetría y termogravimetría diferencial, vienen a corroborar lo anteriormente expuesto. Así, mientras que para el complejo se produce una pérdida lenta y paulatina de masa hasta que se alcanza la

temperatura de descomposición de la ciclodextrina ($\approx 300^{\circ}\text{C}$), en el caso de la mezcla física se producen pérdidas de masa a temperaturas inferiores a 100°C , atribuibles a la descomposición del retinal y a la pérdida de agua de cristalización de las ciclodextrinas.

Los resultados obtenidos en el cálculo de la estequiometría de los distintos complejos indican que ésta es variable. Cabría esperar que la estequiometría fuese 1:1 y sólo en los casos donde la molécula que se va a incluir fuese extremadamente hidrófoba se obtuviesen complejos de estequiometría 1:2 (R/CD), incluyéndose el extremo de ciclohexeno en una de las ciclodextrinas y el otro extremo polar (alcohol, carbonilo, ácido) en otra CD. Sin embargo este hecho no es siempre así, ya que el ácido retinoico que es la molécula más polar de todas las estudiadas muestra una estequiometría 1:2 (R/CD). Las gráficas obtenidas demuestran que en muchos casos la relación estequiométrica es 1:1. Sin embargo también se producen asociaciones 1:2 (R/CD). Dado que en muchos casos el ajuste de los puntos no es todo lo bueno que se pudiera desear, y analizando los resultados punto por punto, podría pensarse en la existencia de complejos en solución de estequiometría diferente, estando favorecida la relación estequiométrica 1:1 a bajas concentraciones de CD. Por el contrario cuando la concentración aumenta se produciría una complejación favorable de estequiometría 1:2 (R/CD) que coexiste con una fracción de moléculas de retinoide que mantiene su estequiometría inicial.

De forma paralela se calcularon las constantes de asociación para los complejos de retinoide con β - y $\text{HP}\beta$ -CD. Considerando los resultados obtenidos en los cálculos estequiométricos y dado el exceso de CD que se pone en solución, se realizaron los cálculos ($1/A$ frente a $1/C^2$) para las constantes de asociación, considerando que la estequiometría es 1:2 (R/CD) puesto que nos hallamos en las condiciones en las que suponemos que es más probable que se originen complejos de esta estequiometría.

Las constantes más elevadas se obtienen para el todo-*trans* retinal, seguido de sus isómeros (9-*cis* y 13-*cis*). Dado que estos isómeros forman complejos de inclusión muy estables con esta CD parece que la distinta geometría molecular de los tres no es el factor determinante en el proceso de inclusión, ya que probablemente la inclusión se realiza por el anillo de ciclohexeno. En el caso del 9-*cis* retinal no se llevó a cabo el cálculo de la constante de asociación con la $\text{HP}\beta$ -CD, debido a la imposibilidad de detectar la formación del complejo. Considerando la disposición espacial del 9-*cis* retinal y teniendo en cuenta

que la cavidad de la HP β -CD es mucho más alargada que la de la β -CD, debido a la sustitución por los grupos hidroxipropilo, es muy probable que resulte estéricamente impedida la formación del complejo de inclusión para este isómero. Así pues, en las distintas experiencias encaminadas a la formación del complejo de este isómero con HP β -CD no se obtiene resultado alguno.

Si comparamos los valores de las constantes obtenidas para los derivados (retinal, ácido retinoico y acetato de retinilo) en disposición todo-*trans*, las citadas constantes de asociación son menores para la HP β -CD que para la β -CD, en todos los compuestos. Ello implica que existe una mayor afinidad de la β -CD por estas moléculas. Esta diferencia de comportamiento podría explicarse mejor considerando el balance hidrofilia/lipofilia de los retinoides que sobre consideraciones geométricas.

Los valores de las constantes de afinidad para la β -CD y los distintos retinoides todo-*trans* son distintos, por ello si la parte incluida es análoga en todas las moléculas hay que buscar la causa de esta diferencia en el grupo funcional característico de cada una de ellas y a la polarizabilidad de la molécula. Este grupo es el origen de diferencias apreciables en la solubilidad de los mencionados retinoides y como para que se produzca la inclusión, las moléculas adheridas a la pared del matraz, han de pasar a la solución antes de incluirse, aquellos derivados que sean menos hidrosolubles tenderán a incluirse con mayor fuerza en la cavidad hidrofóbica, pero también tendrán una mayor dificultad para acceder a la solución acuosa y posteriormente formar el complejo. Así se explica la variabilidad de los resultados a la hora de obtener el complejo, ya que entran en juego dos procesos competitivos, en donde parece que la polaridad es el factor determinante. Se puede observar una relación lineal entre el logaritmo de las constantes de asociación para los complejos formados con la β -CD y el valor de la refracción molar de los retinoides, lo cual indica que la polarizabilidad juega un papel importante en el proceso de inclusión

Para la HP β -CD, los valores de las constantes de asociación son aproximadamente dos órdenes de magnitud menores que los obtenidos para los respectivos complejos con β -CD. Teniendo presente que la HP β -CD es más hidrosoluble y que su cavidad es menos apolar, la fuerza del enlace en las proximidades del radio de Van der Waals puede ser menor, lo que explica que la tendencia a la inclusión sea más baja.

Los análisis de los complejos de retinoides/CD por HPLC demuestran que tras la formación de complejos de inclusión aparecen algunos isómeros en solución, siendo el más favorecido el isómero 13-*cis*, tanto en presencia de ciclodextrinas como de tensoactivos. La presencia de este isómero puede atribuirse a la diferencia de tiempo de preparación de las soluciones en los medios organizados si se comparan con los medios homogéneos, ya que en las 24 horas necesarias para la preparación de los complejos o de las soluciones micelares puede producirse la reacción de isomerización no inducida por vía radiante.

Tras la irradiación de las soluciones, la transformación del todo-*trans* retinal en sus correspondientes fotoisómeros es menor en el caso de las ciclodextrinas y donde se obtiene menor porcentaje de fotoisomerización es en el caso del hexano. Si se compara la transformación del todo-*trans* retinal en los distintos medios con el tiempo, puede apreciarse que la fotoisomerización es mucho más apreciable en el seno de los medios micelares, seguido de los disolventes y finalmente la menor transformación se produce en el caso de las ciclodextrinas.

Del estudio de estos resultados puede deducirse que las ciclodextrinas son los sistemas que impiden de forma más eficaz el proceso de fotoisomerización. Esta afirmación puede explicarse si se considera que en el complejo de inclusión, la libertad de rotación de la molécula de retinal está dificultada debido al medio constreñido que la envuelve. Sin embargo, en las micelas, que pueden considerarse como sistemas dinámicos, donde la inclusión de la molécula en la capa apolar interna es menos fija, la capacidad de rotación de la molécula de retinal no está impedida, lo cual explica que la fotoisomerización transcurra sin dificultad. No obstante en este caso de las micelas, la fotoisomerización es más fácil que en hexano y semejante a la que se produce en el caso del etanol o el acetonitrilo. Ello puede explicarse si se tienen en consideración las características de polaridad del entorno.

En el caso del ácido retinoico, los resultados obtenidos en fase normal indican que al igual que para el retinal, el proceso de fotoisomerización se produce en el seno de los medios acuosos micelares, seguido de los medios homogéneos y son las ciclodextrinas las que proporcionan una mayor protección, al obtenerse las menores reducciones en el porcentaje de isómero todo-*trans* tras la irradiación.

Los resultados obtenidos tras la separación en fase inversa, demuestran que la mayor protección la proporcionan las ciclodextrinas, seguida de los medios micelares y es en etanol donde la fotoisomerización está más favorecida. Puesto que las condiciones de irradiación fueron siempre las mismas, la formación de isómeros también debe ser semejante, independientemente de que para su separación se emplee fase inversa o fase normal. Por tanto si los resultados difieren, es consecuencia del medio elegido para la separación. A la luz de estos resultados parece que la fase inversa es la más apropiada para la cuantificación, y según esto, los medios organizados (ya sean micelas o ciclodextrinas) proporcionan una protección mejor que los disolventes homogéneos (etanol), donde la molécula puede rotar libremente.

La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas permite la cuantificación de los distintos derivados estudiados, con la excepción del retinol. Así, tanto el ácido retinoico como el acetato de retinilo y el retinal, presentan una buena correlación lineal con coeficientes de correlación superiores a 0'99. En el caso del retinol, se realizaron sin éxito ensayos con la β -CD y la HP β -CD, no observándose en ningún caso correlación lineal, no pudiéndose por tanto lograr una cuantificación del mismo en presencia de ciclodextrina.

De los resultados obtenidos se desprende que la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas, puede constituir una alternativa eficaz para la determinación de estos compuestos en medios acuosos, lo cual posee gran interés desde el punto de vista biológico. Los resultados, en el caso del acetato de retinilo, el ácido retinoico y el retinal así lo demuestran, ya que la regresión lineal es buena y la formación de los complejos, en estas condiciones experimentales, es reproducible. Hemos de considerar que el método conlleva la cuantificación en soluciones acuosas, pero como desventaja implica una metodología tediosa (24 horas para la preparación del complejo) lo cual disminuye la versatilidad del método propuesto. Sin embargo, la determinación alternativa de estos compuestos en medios orgánicos va acompañada de laboriosos procedimientos de extracción, con las consiguientes pérdidas de analito, consumo de tiempo y disolventes por lo que desde nuestro punto de vista, la formación de complejos con ciclodextrinas, puede constituir una alternativa valiosa para la determinación de los mismos.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Las distintas técnicas instrumentales empleadas en este estudio (espectrofotometría de absorción UV-VIS, espectroscopia de fluorescencia molecular, espectrofotometría de absorción IR, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y métodos térmicos), ponen de manifiesto la existencia de complejos de inclusión entre retinal, retinol, acetato de retinilo y ácido retinoico, con distintas ciclodextrinas.
2. La estabilidad en el tiempo de los complejos de inclusión con ciclodextrinas, que pudo seguirse mediante espectrofotometría de absorción UV-VIS y espectrofluorimetría, demuestra que la cavidad apolar de las ciclodextrinas constituye un medio que evita la degradación de estas moléculas extremadamente lábiles.
3. La utilización de tensoactivos y ciclodextrinas permite observar luminiscencia a temperatura ambiente del retinal y del ácido retinoico, y mejora la del retinol y el acetato de retinilo en soluciones acuosas, gracias a la protección que aportan estos medios a los estados excitados de dichas moléculas.
4. De los resultados experimentales se deduce que el modo de inclusión más favorecido es aquel en el que el anillo de ciclohexeno penetra en la cavidad de las ciclodextrinas, si bien en el caso del 9-*cis* retinal, la inclusión puede producirse por el extremo polar de la cadena.
5. La β -CD y la HP β -CD son las ciclodextrinas que originan complejos de inclusión con mejores repercusiones analíticas, aunque también se obtienen complejos con la α -CD, la γ -CD, la dimetil- β -CD y la trimetil- β -CD. Los distintos retinoides estudiados forman complejos de inclusión con la β -CD y la HP β -CD de estequiometría 2:1 (CD/R), los cuales coexisten en solución junto con los de estequiometría 1:1.
6. Los complejos de inclusión con la β -CD y la HP β -CD presentan constantes de asociación elevadas, como corresponde a moléculas hidrofóbicas, siendo las

constantes de asociación para los complejos con la β -CD alrededor de dos órdenes de magnitud mayores que las obtenidas en el caso de la HP β -CD.

7. Los análisis realizados por HPLC revelan que tras el proceso de inclusión apenas se produce isomerización. Los fotoproductos obtenidos por irradiación de los complejos de inclusión, analizados por HPLC, ponen de manifiesto que la protección que ofrece el entorno apolar y la rigidez de la cavidad de las ciclodextrinas dificulta el proceso de fotoisomerización.
8. La formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas permite la determinación cuantitativa de retinoides en soluciones acuosas, lo cual posee gran interés desde el punto de vista biológico.

V. CONCLUSIONS

1. Les différentes techniques instrumentales employées dans cette étude (spectrophotométrie d'absorption UV-VIS, spectrofluorimétrie, spectrophotométrie d'absorption IR, résonance magnétique nucléaire et méthodes thermiques) mettent en évidence l'existence de complexes d'inclusion entre plusieurs cyclodextrines et le rétinol, le rétinol, l'acétate de rétinyle et l'acide rétinoïque.
2. L'étude de la stabilité des complexes d'inclusion réalisée au moyen de la spectrophotométrie d'absorption UV-VIS et de la spectrofluorimétrie, montre que la cavité apolaire des cyclodextrines empêche la dégradation des rétinoïdes, molécules extrêmement labiles.
3. L'utilisation de tensioactifs et de cyclodextrines permet l'observation à température ambiante de la luminescence du rétinol et de l'acide rétinoïque, et, améliore celles du rétinol et de l'acétate de rétinyle en solution aqueuse grâce à la protection des états excités de ces molécules.
4. Les résultats expérimentaux permettent de déduire que le mode d'inclusion le plus favorable est celui dans lequel le cyclohexène pénètre dans la cavité des cyclodextrines, même si dans le cas du 9-*cis* rétinol, l'inclusion peut se produire à travers l'extrémité polaire de la chaîne.
5. Bien que des complexes avec la α -, la γ -, la diméthyl- β - et la triméthyl- β -CD soient possibles, c'est avec la β -CD et la HP β -CD que les meilleurs résultats analytiques sont obtenus. Pour ces dernières des complexes de stoechiométrie 2:1 (CD/R) coexistent en solution avec des complexes de stoechiométrie 1:1.
6. Les complexes d'inclusion avec la β -CD et la HP β -CD présentent des constantes de formation très élevées, comme cela est prévisible dans le cas des molécules très hydrophobes. Les constantes d'association des complexes avec la β -CD sont à peu près 100 fois supérieures à celles obtenues dans le cas de la HP β -CD.

7. Les analyses par, HPLC, des photoproduits obtenus par irradiation des complexes d'inclusion, montrent que la protection de l'environnement apolaire, ainsi que la rigidité de la cavité des cyclodextrines, rendent plus difficile le processus de photoisomérisation.
8. La formation de complexes d'inclusion avec les cyclodextrines permet la détermination quantitative des rétinoïdes en solution aqueuse, ce qui est d'un grand intérêt d'un point de vue biologique.

VI. BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS DE LAS REVISTAS UTILIZADAS:

-A:	Analyst
-AACI:	Adv. Anal. Chem. Inst.
-AB:	Anal. Biochem.
-ABB:	Arch. Biochem. Biophys.
-ABC:	Agr. Biol. Chem.
-AC:	Anal. Chem.
-ACA:	Analytica Chimica Acta.
-ACASH:	Acta Chim. Acad. Sci. Hung.
-ACIEE:	Angew. Chem. Int. Ed. Engl.
-ACIS:	Adv. Colloid. Interf. Sci.
-ACC:	Adv. Carbohydr. Chem.
-ACR:	Acc. Chem. Res.
-ACry:	Acta Crys.
-ACS:	Acta Chem. Scand.
-ACSB:	Acta Cryst. Sect. B.
-AgC:	Angew. Chem.
-AIC:	Adv. in Catalysis.
-AK:	Arkiv. Kemi.
-AL:	Anal. Lett.
-AnnC:	Ann. Chem.
-AnnC:	Annal. Chimie (Paris).
-AP:	Adv. Photochem.
-APC:	Adv. Protein Chem.
-APCS:	Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.
-APOC:	Adv. Phys. Org. Chem.
-ARB:	Ann. Rev. Biochem.
-AS:	Appl. Spect.
-B:	Biochemistry.
-BBA:	Biochem. Biophys. Acta.
-BBRC:	Biochem. Biophys. Res. Commun.
-BC:	Biophys. Chem.
-BCSJ:	Bull. Chem. Soc. Jpn.

-Bi:	Biochim.
-BioC:	Biorganic. Chem.
-Bit:	Bitamin.
-BM:	Biochim. Med.
-Bp:	Biopolymers.
-BSCF:	Bull. Soc. Chim. Fr.
-CaR:	Carbohydr. Res.
-CB:	Chem. Ber.
-CC:	Clin. Chem.
-CI:	Chem. and Ind.
-CIT:	Chem. Ing. Tech.
-CJC:	Can. J. Chem.
-CL:	Chem. Lett.
-CPB:	Chem. Pharm. Bull.
-CPL:	Chem. Phys. Lett.
-CPS:	Colloid and Polymer Sci.
-CR:	Chem. Rev.
-CRASP:	Comp. Rend. Acad. Sci. Paris.
-CS:	Chem. Soc.
-CSR:	Chem. Soc. Rev.
-CTR:	Cell Tissue Res.
-CW:	Chem. Weekbl.
-DDIP:	Drug. Develop. Incl. Pharm.
-DFS:	Discuss. Faraday Soc.
-DS:	Die Stärke.
-EA:	Electrochim. Acta.
-EST:	Environ. Sci. Technol.
-FEP:	Farmaco Ed. Prat.
-PPFASEB:	Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.
-GCI:	Gazz. Chim. Acta.
-H:	Heterocycles.
-HBM:	Heidelberg Beitr. Mineral.
-HCA:	Helv. Chim. Acta.
-IC:	Inorg. Chem.

-ICo:	Incl. Compounds.
-IJC:	Indian J. Chem.
-IJMR:	Indian J. Med. Res.
-IJP:	International J. Pharm.
-IJVNR:	Int. J. Vitam. Nutr. Res.
-IL:	International Lab.
-IO:	Invest. Ophtalmol.
-JACS:	J. Am. Chem. Soc.
-JAOAC:	J. Assoc. Off. Anal. Chem.
-JB:	J. Biochem.
-JBC:	J. Biol. Chem.
-JC:	J. Chromatography.
-JCIS:	J. Colloid. Interface Sci.
-JCP:	J. Chem. Phys.
-JCS:	J. Chem. Soc.
-JCSc:	J. Chromatogr. Sci.
-JCSCC:	J. Chem. Soc. Chem. Commun.
-JCSPT:	J. Chem. Soc. Perkin TRans I.
-JCSFT:	J. Chem. Soc. Faraday Trans II.
-JEC:	J. Electroanal. Chem.
-JES:	J. Electrochem. Soc.
-JGP:	J. Gen. Phisiol.
-JHRC:	J. High Resolut. Chromatogr.
-JHRCCC:	J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.
-JIP:	J. Inclusion Phenom.
-JIPMRC:	J. Incl. Phenom. Mol. Reconigit. Chem.
-JJA:	Jpn. J. Antibio.
-JL:	J. Lumin.
-JLC:	J. Liquid Chromatogr.
-JLR:	J. Lipid. Res.
-JM:	J. Microchem.
-JMB:	J. Mol. Biol.
-JNSV:	J. Nutr. Sci. Vitaminol.
-JOC:	J. Org. Chem.

-JOCU:	J. Org. Chem. USSR.
-JP:	J. Photochem.
-JPBA:	J. Pharm. Biomed. Analysis.
-JPC:	J. Phys. Chem.
-JPrC:	J. Protein Chem.
-JPh:	J. Phys. (Paris).
-JPIC:	J. Planar Chromatogr.
-JPos:	J. Pol. Sci.
-JPP:	J. Pharm. Pharmacol.
-JPPB:	J. Photochem. Photobiol.
-JPS:	J. Pharm. Sci.
-JPSJ:	J. Pharm. Soc. Jpn.
-JPSPC:	J. Polym. Sci. Polym. Chem.
-JSC:	J. Sol. Chem.
-KZZP:	Kolloid Z. Z. Polym.
-LS:	Life Sci.
-M:	Macromolecules.
-MA:	Mikrochim. Acta.
-MJ:	Microchem. J.
-MRC:	Magn. Reson. Chem.
-N:	Nature.
-NJC:	Nouv. J. Chem.
-Nw:	Naturwiss.
-P:	Pharmazie.
-PAH:	Pharm. Acta Helv.
-PBC:	Prog. Biorg. Chem.
-PI:	Pharm. Int.
-PJ:	Polym. J.
-PNACS:	Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
-PP:	Photochem. Photobiol.
-QRCS:	Quart. Rev. Chem. Soc.
-RPAC:	Revs. Proc. Appl. Chem.
-RS:	Ric. Sci.
-RTCPB:	Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.

-S:	Science.
-SA:	Scientific American.
-SpA:	Spectrochim. Acta.
-Sy:	Synthesis.
-T:	Tetrahedron.
-Ta:	Talanta.
-TAC:	Trends. Anal. Chem.
-TFS:	Trans. Faraday Soc.
-TL:	Tetrahedron Lett.
-TCC:	Top. Curr. Chem.
-VR:	Vision Res.
-WKW:	Wien Klin. Wochenschr.
-ZC:	Z. Chem.
-ZN:	Z. Naturforsch.
-ZP:	Z. Phys.
-ZPC:	Z. Phys. Chem.
-ZUNG:	Z. Unters. Nahr. Genuss.

ARTICULOS:

- [1891 CRASP 536] A. Villiers. *Comp. Rend. Acad. Sci. Paris*, **112**, 536 (1891).
- [1903 ZUNG 865] F. Schardinger. *Z. Unters. Nahr. Genussm.*, **6**, 865 (1903).
- [1904 WKW 207] F. Schardinger. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **17**, 207 (1904).
- [1911 ZPC 179] J.W. McBain, M. Taylor. *Z. Phys. Chem.*, **76**, 179 (1911).
- [1926 JB 497] T.H. Carr, E.A. Price, *J. Biochem*, **20**, 497, (1926).
- [1928 AnnCP 113] P. Job. *Annal. Chimie (Paris)*, **9**, 113 (1928).
- [1930 ZP 245] F. London. *Z. Phys.*, **63**, 245 (1930).
- [1934 JACS 658] M. Lineweaver, D. Burk. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658 (1934).
- [1935 AnnC 102] K. Freudenberg, R. Jacobi. *Ann. Chem.*, **518**, 102 (1935).
- [1941 JACS 437] W.C. Vosburgh, G.R. Cooper. *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 437 (1941).
- [1942 JACS 1651] D. French, R.E. Rundle. *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 1651 (1942).
- [1942 JBC 85] G.S. Eadie. *J. Biol. Chem.*, **146**, 85 (1942).
- [1942 N 992] R.P. Penrose. *Nature*, **163**, 992 (1942).
- [1943 JACS 1959] H. Sobotka, S. Kann, E. Loewenstein. *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 1959 (1943).

- [1944 JBC 635] H. Sobotka, S. Kann, W. Winternitz. *J. Biol. Chem.*, **152**, 635 (1944).
- [1945 JPC 507] H.S. Frank, M.W. Evans. *J. Phys. Chem.*, **13**, 507 (1945).
- [1946 JBC 177] O.A. Bessey, O.H. Lowry, M.J. Brock, J.A. Lopez. *J. Biol. Chem.*, **166**, 177 (1946).
- [1947 JACS 679] M.L. Corin, W.D. Herkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 679 (1947).
- [1948 JBC 797] M.A. Swanson, C.F. Cori. *J. Biol. Chem.*, **172**, 797 (1948).
- [1948 ZN 464] K. Freudenberg, F. Cramer. *Z. Naturforsch.*, **36**, 464 (1948).
- [1949 ACS 91] K. Myrbäck, E. Willstaedt. *Acta Chem. Scand.*, **3**, 91 (1949).
- [1949 AK 129] K. Myrbäck, T. Järneström, *Arkiv Kemi.*, **1**, 129 (1949).
- [1949 JACS 353] D. French, M.L. Levine, J.K. Pazur, E. Norberg. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 353 (1949).
- [1949 JACS 356] D. French, M.L. Levine, J.K. Pazur, E. Norberg. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 356 (1949).
- [1949 JACS 2703] H.A. Benesi, J.H. Hildebrand. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703 (1949).
- [1950 CB 296] K. Freudenberg, F. Cramer. *Chem. Ber.*, **83**, 296 (1950).
- [1950 JACS 5148] D. French, R.L. McIntire. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5148 (1950).

- [1950 JACS 5150] D. French, R.L. McIntire. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 5150 (1950).
- [1951 CB 851] F. Cramer. *Chem. Ber.*, **84**, 851 (1951).
- [1951 CB 855] F. Cramer. *Chem. Ber.*, **84**, 855 (1951).
- [1951 JB 271] A. Fujita, M. Aoyama. *J. Biochem.*, **38**, 271 (1951).
- [1952 ACS 1186] R.S. Alm. *Acta Chem. Scand.*, **6**, 1186 (1952).
- [1952 AgC 136] F. Cramer. *Angew. Chem.*, **64**, 136 (1952)
- [1952 HBM 124] W. Boschert. *Heidelberg Beitr. Mineral.*, **3**, 124 (1952).
- [1952 JACS 811] R.S. Mulliken. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 811 (1952).
- [1954 APC 1] W. Keuzmann. *Adv. Protein Chem.* **14**, 1 (1954).
- [1954 CB 806] H.V. Dietrich, F. Cramer. *Chem. Ber.*, **87**, 806 (1954).
- [1954 JGP 381] R. Hubbard. *J. Gen. Physiol.*, **37**, 381 (1954).
- [1955 AnnC 81] F. Cramer, D. Steinle. *Ann. Chem.*, **595**, 81 (1955).
- [1955 IJMR 391] N.K. De. *Indian J. Med. Res.*, **43**, 391 (1955).
- [1955 RPAC 143] F. Cramer. *Revs. Proc. Appl. Chem.*, **5**, 143 (1955).
- [1956 AgC 115] F. Cramer. *Angew. Chem.*, **68**, 115 (1956).
- [1956 RTCPB 891] F. Cramer. *Rev. Trav. Chim. Pays-Bas*, **75**, 891 (1956).
- [1957 ACC 189] D. French. *Adv. Carbohydr. Chem.*, **12**, 189 (1957).

- [1957 CB 2561] F. Cramer, F.M. Heuglein. *Chem. Ber.*, **90**, 2561 (1957).
- [1957 CB 2572] F. Cramer, F.M. Heuglein. *Chem. Ber.*, **90**, 2572 (1958).
- [1957 JPoS 791] K. Freudenberg. *J. Polymer Sci.*, **23**, 791 (1957).
- [1958 CB 308] F. Cramer, F.M. Heuglein. *Chem. Ber.*, **91**, 308 (1958).
- [1958 CI 892] F. Cramer, W. Dietsche. *Chem. and Ind.*, **892** (1958).
- [1959 APC 1] W. Kauzmann. *Adv. Protein. Chem.*, **14**, 1 (1959).
- [1959 CB 1739] F. Cramer, W. Dietsche. *Chem. Ber.*, **92**, 1739 (1959).
- [1959 DFS 180] W.A. Hagins, W.H. Jennings. *Discuss. Faraday Soc.*, **27**, 180 (1959).
- [1959 JPC 650] C. Botre, V. Crescenzi. *J. Phys. Chem.* **63**, 650 (1959).
- [1959 JPSJ 988] Mine. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, **78**, 988 (1959).
- [1959 QRCS 183] A.D. Buckingham. *Quart. Rev. Chem. Soc.*, **13**, 183 (1959).
- [1961 BBRC 11] A.O. Pulley, D. French. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5**, 11 (1961).
- [1961 JACS 2312] W. Schlenk, D.M. Sand. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2312 (1961).
- [1962 B 89] L.C. Craig, A.O. Pulley. *Biochemistry*, **1**, 89 (1962).
- [1962 N 472] M.B. Neiman, E.G. Rozantsev, YuG.Manedova. *Nature*, 196,472 (1962).

- [1963 ACry 62] C.H. Stam, C.H. MacGillavry. *Acta Cryst.*, Sect. B, **16**, 62 (1963).
- [1963 ARB 269] F.M. Richards. *Ann. Rev. Biochem.*, **32**, 269 (1963).
- [1963 Bit 349] T. Ninomiya, K. Kidokoro, M. Horiguchi, N. Higosaki. *Bitamin*, **27**, 349 (1963).
- [1963 Bp 527] V.S.R. Rao, J.F. Foster. *Biopolymers*, **1**, 527 (1963).
- [1963 JACS 114] A.K. Colter, S.S. Wang. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 114 (1963).
- [1963 JPC 951] V.S.R. Rao, J.F. Foster. *J. Phys. Chem.*, **67**, 951 (1963).
- [1963 JPS 132] J. Cohen, J.L. Lach. *J. Pharm. Sci.*, **52**, 132 (1963).
- [1964 JCIS 722] P. Mukerjee, *J. Colloid. Interface Sci.*, **19**, 722 (1964).
- [1964 JPoS 171] B. Casu, M. Reggiani. *J. Polym. Sci.*, **7**, 171 (1964).
- [1964 JPS 69] J.L. Lach, T.F. Chin. *J. Pharm. Sci.*, **53**, 69 (1964).
- [1964 JPS 924] J.L. Lach, T.F. Chin. *J. Pharm. Sci.*, **53**, 924 (1964).
- [1964 KZZP 143] T. Nakagawa, K. Tori. *Kolloid Z. Z. Polym.*, **194**, 143 (1964).
- [1964 TL 1775] R. Briere, H. Lemaire, A. Rassat. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 1775 (1964).
- [1965 AACI 117] T. Higuchi, K. Connors. *Adv. Anal. Chem. Instr.*, **4**, 117 (1965).
- [1965 ABB 153] D. French, A.O. Pulley, J.A. Effenberg, M.A. Rougvie, M. Abdullah. *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 153 (1965).

- [1965 CJC 2652] C.A. Class. *Can. J. Chem.*, **43**, 2652 (1965).
- [1965 JACS 1115] F. Cramer, W. Kampe. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1115 (1965).
- [1965 JACS 1121] N. Hennrich, F. Cramer. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1121 (1965).
- [1965 JACS 2779] A. Hybl, R.E. Rundle, D.E. Williams. *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 2779 (1965).
- [1965 JMB 64] G. Schwartz. *J. Mol. Biol.*, **11**, 64 (1965).
- [1965 JPS 1745] W.A. Pauli, J.L. Lach. *J. Pharm. Sci.*, **54**, 1745 (1965).
- [1965 TFS 182] J. Clifford, B.A. Pethica. *Trans. Faraday Soc.*, **61**, 182 (1965).
- [1966 ACS 2019] J.C. Erikson, G. Gillberg. *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2019 (1966).
- [1966 BSCF 2144] M. Mousseron-Canet, D. Lerner, J.D. Mani. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2144 (1966).
- [1966 DS 218] B. Casu, M. Reggiani. *Die Stärke*, **18**, 218 (1966).
- [1966 JPC 2138] A. Ray, P. Mukerjee. *J. Phys. Chem.*, **70** , 2138 (1966).
- [1966 RS 733] B. Casu, L. Rava. *Ric. Sci.*, **36**, 733 (1966).
- [1966 T 3061] B. Casu, M. Reggiani, G.G. Gallo, A. Vigevani. *Tetrahedron*, **22**, 3061 (1966).
- [1967 ACIS 241] P. Mukerjee, *Adv. Colloid. Interface Sci.*, **1**, 241 (1967).

- [1967 BBA 639] M.H. Zile, R.J. Emerick, H.F. DeLuca. *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 639 (1967).
- [1967 CaR 318] N. Wiederhof, I.N.J.J. Lemmers. *Carbohydr. Res.*, **4**, 318 (1967).
- [1967 CB 3146] I.M. Hartman, W. Hartman, G.O. Schenck, *Chem. Ber.*, **100**, 3146 (1967).
- [1967 CC 1039] B.S. Sherman. *Clin. Chem.*, **13**, 1309 (1967).
- [1967 FPFASEB 636] J.A. Olson, V. Pungpapongsa. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **26**, 636 (1967).
- [1967 HCA 1243] M. Vecchi, W. Vetter, W. Walther, S.F. Jermstad, G.W. Schutt. *Helv. Chim. Acta*, **50**, 1243 (1967).
- [1967 JACS 14] F. Cramer, W. Saenger, H.C. Spatz. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 14 (1967).
- [1967 JACS 2495] C.J. Pedersen. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2495 (1967).
- [1967 JACS 3242] R.L. Van Etten, J.F. Sebastian, G.A. Clowes, M.L. Bender. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3242 (1967).
- [1967 JACS 3253] R.L. Van Etten, G.A. Clower, J.F. Sebastian, M.L. Bender. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3253 (1967).
- [1967 N 369] R. Cecil. *Nature*, **214**, 369 (1967).
- [1967 Nw 625] F. Cramer, H. Mettler. *Naturwiss.*, **54**, 625 (1967).
- [1968 AB 307] M. Zile, H.F. DeLuca. *Anal. Biochem.*, **25**, 307 (1968).

- [1968 ACry 1560] J.A. Hamilton, L.K. Steinrauft, R.L. Vanetten. *Acta Cryst.*, **324**, 1560 (1968).
- [1968 BSCF 4639] M. Mousseron-Canet, D. Lerner, J.D. Mani. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 4639 (1968).
- [1968 CJC 3025] C. Giannotti. *Can. J. Chem.*, **46**, 3025 (1968).
- [1968 CaR 1] N. Wiederhof, J.N.J.J. Lammers. *Carbohydr. Res.*, **7**, 1 (1967).
- [1968 CS 217] B. Casu, G.G. Gallo, M. Reggiani, A. Vigevani. *Chem. Soc.*, **27**, 217 (1968).
- [1968 DS 387] B. Casu, G.G. Gallo, M. Reggiani, A. Vigevani. *Die Stärke*, **20**, 387 (1968).
- [1968 IJC 140] W. Melik, A. Jain. *Indian J. Chem.*, **72**, 140 (1968).
- [1968 JPC 4129] A.S. Waggoner, A.D. Keith, O.H. Griffith. *J. Phys. Chem.*, **72**, 4129 (1968).
- [1968 JPS 44] T.F. Chin, P.M. Chung, J.L. Lach. *J. Pharm. Sci.*, **57**, 44 (1968).
- [1968 S 230] G. Wald. *Science*, **162**, 230 (1968).
- [1968 T 803] B. Cassu, M. Reggiani, G.G. Gallo, A. Vigevani. *Tetrahedron*, **24**, 803 (1968).
- [1969 B 2742] B. Rubalcava, D.M. DeMuñoz, C. Gitler. *Biochemistry*, **8**, 2742 (1969).

- [1969 CB 494] F. Cramer, G. Mackensen, K. Sense. *Chem. Ber.*, **102**, 494 (1969).
- [1969 CC 479] S.R. Targan, S. Merrill, A.D. Schwabe. *Clin. Chem.*, **15**, 479 (1969).
- [1969 DS 119] N. Wiedenhof, J.N.J.J. Lammers, C.L. Van Panthaleon, B. Van Eck, *Die Stärke*, **21**, 119 (1969).
- [1969 JACS 4035] J.L. Lippert, M.W. Hanna, P.J. Trotter. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4035 (1969).
- [1969 JCP 4106] A.J. Thomson. *J. Chem. Phys.*, **51**, 4106 (1969).
- [1969 N 825] D.J. Patel. *Nature*, **221**, 825 (1969).
- [1970 AB 435] R.L. Lin, G.R. Waller, E.D. Mitchell, K.S. Yang, E.C. Nelson. *Anal. Biochem.*, **35**, 435 (1970).
- [1970 ABC 568] K. Takeo, T. Kuge. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 568 (1970).
- [1970 ABC 1416] K. Takeo, T. Kuge. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1416 (1970).
- [1970 ABC 1787] K. Takeo, T. Kuge. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1787 (1970).
- [1970 APOC 271] E.J. Fendler, J.H. Fendler. *Adv. Phys. Org. Chem.*, **8**, 271 (1970).
- [1970 BCSJ 1909] Y. Matsui, M. Naruse, K. Mochida, Y. Date. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 1909 (1970).
- [1970 BSCF 1968] D.A. Lerner, J.C. Mai, C.M. Mousseron. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1968 (1970).

- [1970 CaR 150] B. Casu, M. Reggiani, G.G. Gallo, A. Vigevani. *Carbohydr. Res.*, **12**, 150 (1970).
- [1970 CaR 157] B. Casu, M. Reggiani, G.G. Gallo, A. Vigevani. *Carbohydr. Res.*, **12**, 157 (1970).
- [1970 CaR 351] P.R. Sunderajan, V.S.R. Rao, *Carbohydr. Res.*, **13**, 351 (1970).
- [1970 CB 1132] H. Irngartinger, L. Leiserowitz, G.M.J. Schmidt. *Chem. Ber.*, **103**, 1132 (1970).
- [1970 CB 2138] F. Cramer, G. Mackersen. *Chem. Ber.*, **103**, 2138 (1970).
- [1970 JACS 6286] D.O. Cowan, R.E. Dusko, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6286 (1970).
- [1970 JACS 6419] P. Mukerjee, A.K. Ghosh. *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6419 (1970).
- [1970 JCS 877] D.A. Rees. *J. Chem. Soc.*, **13**, 877 (1970).
- [1970 JCSCC 2] P.V. Demarco, A.L. Thakkar. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **2** (1970).
- [1970 JPC 4137] J.T. Richards, G. West, J.K. Thomas, *J. Phys. Chem.*, **74**, 4137 (1970).
- [1970 PP 249] A. Kropf, R. Hubbard. *Photochem. Photobiol.*, **12**, 249 (1970).
- [1970 RTCPB 845] C. Van Hoodank, C.C. Gross. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **89**, 845 (1970).

- [1971 ACSB 667] H. Schenk. *Acta Cryst. Sect. B*, **27**, 667 (1971).
- [1971 BM 67] J.N. Thompson, P. Erdody, R. Brien, T.K. Murray. *Biochem. Med.*, **5**, 67 (1971).
- [1971 EA 689] M.C. Justice, R. Bury, J.C. Justice. *Electrochim. Acta*, **16**, 689 (1971).
- [1971 JPS 652] A.L. Thakkar, P.V. Demarco. *J. Pharm. Sci.*, **60**, 652 (1971).
- [1971 N 558] B. Honig, M. Karplus. *Nature*, **229**, 558 (1971).
- [1971 PNACS 1289] B. Honig, B. Hudson, B.D. Sykes, M. Karplus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1289 (1971).
- [1971 RTCPB 680] C. Van Hooidek, J.C.A.E. Breebaart. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **90**, 680 (1971).
- [1972 AgC 16] C.J. Pedersen, H.K. Frensdorff, *Angew. Chem.*, **11**, 16 (1972).
- [1972 AL 637] N. Ishibashi, K. Kina. *Anal. Lett.*, **5**, 637 (1972).
- [1972 BBA 670] D.S. Goodman, R.B. Leslie. *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 670 (1972).
- [1972 JACS 1109] B.J. Bulkin, N. Krishnamachari. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1109 (1972).
- [1972 JACS 5089] G.A. Davis. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5089 (1972).
- [1972 JB 67] K. Takahashi, J. Ono. *J. Biochem.*, **72**, 67 (1972).

- [1972 JCIS 145] M. J. Dorich, J.A. Mann, A. Kawamoto. *J. Colloid Interface Sci.*, **41**, 145 (1972).
- [1972 JCIS 424] J. Novodoff, H. Rosano, H. Hoyer. *J. Colloid Interface Sci.*, **38**, 424 (1972).
- [1972 JCP 3649] G. Beck, J.K. Thomas. *J. Chem. Phys.*, **57**, 3649 (1972).
- [1972 JPC 1460] E.J. Fendler, C.L. Day, J.H. Fendler. *J. Phys. Chem.*, **76**, 1460 (1972).
- [1972 N 392] P.C. Manor, W. Saenger. *Nature*, **237**, 392 (1972).
- [1973 AIC 209] D.W. Griffiths, M.L. Bender, *Adv. in Catalysis.*, **23**, 209 (1973).
- [1973 BBA 245] K. Larson, R.P. Rand. *Biochim. Biophys. Acta* **326**, 245 (1973).
- [1973 BBRC 666] T. Kinoshita, F. Inuma, A. Tsuji. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 666 (1973).
- [1973 CC 977] J.D. Pollack, G.M. Owen, P.J. Garry, D. Clark. *Clin. Chem.*, **19**, 977 (1973).
- [1973 CIT 646] W. Reif, H. Grassner. *Chem. Ing. Tech.*, **45**, 646 (1973).
- [1973 GCI 117] G. Cainelli, G. Cardillo, M. Contento, P. Grasselli, A.U. Ronchi. *Gazz. Chim. Ita.*, **103**, 117 (1973).
- [1973 IJVNR 127] J. Kahan. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **43**, 127 (1973).
- [1973 JACS 4871] E. Williams, B. Sears, A. Allerhand, E.H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4871 (1973).

- [1973 JACS 5508] R.R. Hantale, N.E. Schore, N.J. Turro. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5508 (1973).
- [1973 JACS 8223] W.H. Waddell, A.M. Schaffer, R.S. Becker. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 8223 (1973).
- [1973 JBC 7773] S. Futterman, M.H. Rollins. *J. Biol. Chem.*, **248**, 7773 (1973).
- [1973 JC 410] T.W. Fenton, H. Vogtmann, D.R. Clandinin. *J. Chromatogr.*, **77**, 410 (1973).
- [1973 JC 447] M. Vecchi, J. Vesely, G. Oesterhelt. *J. Chromatogr.*, **83**, 447 (1973).
- [1973 JCSFT 1321] J. Oakes. *J. Chem. Soc. Faraday Trans II*, **69**, 1321 (1973).
- [1973 PBC 1] E.H. Cordes, C. Gitler. *Prog. Biorg. Chem.*, **2**, 1 (1973).
- [1974 ACIEE 156] W. Saenger, M. Noltemeyer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **156** (1974).
- [1974 ACIEE 552] W. Saenger, M. Noltemeyer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **13**, 552 (1974).
- [1974 BCSJ 3165] K. Shirame. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 3165 (1974).
- [1974 CPS 222] J.A. Trisnadi, H.M. Boessler, R.C. Schulz. *Colloid and Polymer Sci.*, **252**, 222 (1974).
- [1974 CR 351] J.J. Christensen, D.I. Eatough, R.M. Izatt, *Chem. Rev.*, **74**, 351 (1974).
- [1974 IJVNR 375] A. Vahlquist. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **44**, 375 (1974).

- [1974 JACS 1229] D.O. Cowan, J.C. Koziar. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 1229 (1974).
- [1974 JACS 3630] P.C. Manor, W. Saenger. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3630 (1974).
- [1974 JACS 7869] M.Grätzel, K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7869 (1974).
- [1974 JACS 8081] P. Colson, H.J. Jennigs, I.C.P. Smith. *J. Am. Chem. Soc.*, **9**, 8081 (1974).
- [1974 JLR 517] Y.L. Ito, M.H. Zile, H.M. Ahrens, H.F. DeLuca. *J. Lipid. Res.*, **15**, 517 (1974).
- [1974 JMB 77] A. Wishnia, S.J. Lappi. *J. Mol. Biol.*, **82**, 77 (1974).
- [1974 JPC 190] P. Infelta, M. Grätzel, J.K. Thomas. *J. Phys. Chem.*, **78**, 190 (1974).
- [1974 JPC 1024] E.A.G. Aniansson, S. Wall. *J. Phys. Chem.*, **78**, 1024 (1974).
- [1974 MJ 26] N. Ishibashi, K. Kina. *Microchem. J.*, **19**, 26 (1974).
- [1974 S 803] D.J. Cram, J.M. Cram. *Science*, **183**, 803 (1974).
- [1975 A 827] S.S. Atuma, K. Lundström, J. Lindquist. *Analyst.*, **100**, 827 (1975).
- [1975 BCSJ 375] K. Harata, H. Uedaira. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 375 (1975).
- [1975 BCSJ 2264] H. Okabayashi, M. Okuyama, T. Kitagawa. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2264 (1975).

- [1975 BCSJ 2409] K. Harata. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2409 (1975).
- [1975 BCSJ 2755] M. Koshinuma, T. Sasaki. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2755 (1975).
- [1975 CC 1031] M.G.M. Deruyter, A.P. De Leenheer. *Clin. Chem.*, **21**, 1031 (1975).
- [1975 CPB 188] M. Otagiri, K. Uekama, K. Ikeda. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 188 (1975).
- [1975 CPB 201] K. Ikeda, K. Uekama, M. Otagiri. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 201 (1975).
- [1975 CPB 1205] Y. Hamada, N. Nambu, T. Nagai. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1205 (1975).
- [1975 CPB 1421] K. Uekama, M. Otagiri, Y. Kanie, S. Tanaka, K. Ikeda. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1421 (1975).
- [1975 CPL 329] M. Wong, M. Grätzel, J.K. Thomas. *Chem. Phys. Lett.*, **30**, 329 (1975).
- [1975 CPL 451] R.R. Birge, K. Schulten, M. Karplus. *Chem. Phys. Lett.*, **31**, 451 (1975).
- [1975 IC 2990] K. Letts, R.A. Mackay. *Inorg. Chem.*, **14**, 2990 (1975).
- [1975 IC 2993] K. Letts, R.A. Mackay. *Inorg. Chem.*, **14**, 2993 (1975).
- [1975 IO 125] S. Futterman, D. Swanson, R.E. Kalina. *Invest. Ophthalmol.*, **14**, 125 (1975).

- [1975 JACS 249] D.O. Cowan, J.C. Koziar. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 249 (1975).
- [1975 JACS 1023] R. Rowan III, B.D.J. Sykes. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1023 (1975).
- [1975 JACS 1209] K. Flohr, R.M. Paton, E.T. Kaiser. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1209 (1975).
- [1975 JACS 6869] B. Siegel, R. Breslow. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 6869 (1975).
- [1975 JPS 1585] S.G. Frank. *J. Pharm. Sci.*, **64**, 1585 (1975).
- [1975 TL 3325] D.D. McNicol. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3325 (1975).
- [1976 ACASH 73] J. Szejtli, Zs. Budei. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **91**, 73 (1976).
- [1976 ACR 121] K. Seff, *Accounts Chem. Res.*, **9**, 121 (1976).
- [1976 BCSJ 2066] K. Harata. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 2066 (1976).
- [1976 BioC 187] W. Saenger, M. Noltemeyer, P.C. Manor, B. Hingerty, B. Klar. *Bioorg. Chem.*, **5**, 187 (1976).
- [1976 BioC 197] R.J. Bergeron, M.P. Meeley. *Bioorg. Chem.*, **5**, 197 (1976).
- [1976 BioC 425] R.J. Bergeron, R. Rowan III. *Bioorg. Chem.*, **5**, 425 (1976).
- [1976 CPB 1146] M. Otagiri, T. Miyaji, K. Uekama, K. Ikeda. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1146 (1976).
- [1976 CPB 1155] T. Miyaji, Y. Kurono, K. Uekama, K. Ikeda. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1155 (1976).

- [1976 FEP 244] C. Menicagli, S. Silvestri, L. Nucci. *Farmaco Ed. Prat.*, **31**, 244 (1976).
- [1976 JACS 1601] H. Selig, M. Rabinovitz, I. Agranet, C.-H. Lin. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1601 (1976).
- [1976 JACS 2391] M. Wong, J.K. Thomas, M. Gratzel. *J. Am. Che. Soc.*, **98**, 2391 (1976).
- [1976 JACS 3357] B. Hingerty, W. Saenger. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3357 (1976).
- [1976 JACS 4189] W.H. Waddell, R. Crouch, K. Nakanishi, N.J. Turro. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 4189 (1976).
- [1976 JACS 5349] S.A. Alkatus, M. Grätzel. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5349 (1976).
- [1976 JACS 5723] S.A. Alkatus, G. Beck, M. Grätzel. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5349 (1976).
- [1976 JACS 5727] I. Tabushi, K. Sasaki, Y. Kuroda, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5727 (1976).
- [1976 JACS 7099] T. Takemura, P.K. Das, G. Hug, R.S. Becker. *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7099 (1976).
- [1976 JAOAC 1125] G.B. Subramanyam, D.B. Parish. *J. Assoc.Off. Anal. Chem.*, **59**,1125 (1976).
- [1976 JB 393] H. Kondo, H. Nakatani, K. Hiromi. *J. Biochem.*, **79**, 393 (1976).
- [1976 JC 225] M. Holasová, J. Blattná. *J. Chromatogr.*, **123**, 225 (1976).

- [1976 JC 317] P.A. Asmus, J.W. Jorgenson, M. Novotny. *J. Chromatogr.*, **126**, 317 (1976).
- [1976 JCSCC 779] J.G. Gourcy, M. Hodler, B. Terem, J.H.P. Utley. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 779 (1976).
- [1976 JOCU 2532] G.P. Chernysh, V.M. Kozhukhovskaya, L.V. Yanchuck, N.M. Savel'eva, G.I. Samokhvalov. *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **12**, 2532 (1976).
- [1976 JPC 1462] K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas. *J. Phys. Chem.*, **80**, 1462 (1976).
- [1976 JPC 2265] R.S. Becker, G. Hug, P.K. Das, A.M. Schaffer, T. Takemura, N. Yamamoto, W. Waddell. *J. Phys. Chem.*, **80**, 2265 (1976).
- [1976 JPC 2661] T. Okubo, M. Kitano, N. Ise. *J. Phys. Chem.*, **80**, 2661 (1976).
- [1976 JPS 379] K.A. Connors, J.M. Lipari. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 379 (1976).
- [1976 JPSPC 2009] M. Komiyama, M. Hirai. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **14**, 2009 (1976).
- [1976 Sy 168] G.W. Gokel, M.D. Durst, *Synthesis*, 168 (1976).
- [1976 TL 3327] I. Tabushi, Y. Kuroda, Y. Kimura, *Tetrahedron Lett.*, 3327 (1976).
- [1977 ACR 133] J.K. Thomas. *Acc. Chem. Res.*, **10**, 133 (1977).
- [1977 BCSJ 3365] Y. Murakami, Y. Aoyama, M. Kide, B. Nakano. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 3365 (1977).

- [1977 CPL 501] K. Kalyanasundaram, F. Grieser, J.K. Thomas. *Chem. Phys. Lett.*, **51**, 501 (1977).
- [1977 CPL 542] C. Wolff, M. Grätzel. *Chem. Phys. Lett.*, **52**, 542 (1977).
- [1977 H 1833] T. Osa, T. Matsue, M. Fujihira. *Heterocycles*, **6**, 1833 (1977).
- [1977 HCA 881] R. Hänni, F. Bigler. *Helv. Chim. Acta*, **60**, 881 (1977).
- [1977 HCA 2309] R. Hänni, F. Bigler, W. Vetter, G. Englert, P. Loeliger. *Helv. Chim. Acta*, **60**, 2309 (1977).
- [1977 JACS 1735] D.J. Wood, F.E. Hruska, W. Saenger. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1735 (1977).
- [1977 JACS 4730] M. Wong, J.K. Thomas, T. Nowak. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 4730 (1977).
- [1977 JACS 5146] R. Bergeron, M.A. Channing, G.J. Gibeily, D.M. Pillor. *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5146 (1977).
- [1977 JC 331] K. Tsukida, A. Kodama, M. Ito. *J. Chromatogr.*, **134**, 331 (1977).
- [1977 JPC 944] R.P. Rohrbach, L.J. Rodriguez, E.M. Eyring, J.F. Wojcik. *J. Phys. Chem.*, **81**, 944 (1977).
- [1977 JPC 2176] K. Kalyanasundaram, J.K. Thomas. *J. Phys. Chem.*, **81**, 2176 (1977).
- [1977 JPS 706] K. Uekama, F. Hirayama, K. Ikeda, K. Inaba. *J. Pharm. Sci.*, **66**, 706 (1977).

- [1977 M 676] A. Harada, M. Furue, S. Nazukara, *Macromolecules*, **10**, 676 (1977).
- [1978 AB 25] A.M. McCormick, J.L. Napoli, H.F. DeLuca. *Anal. Biochem.*, **86**, 25 (1978).
- [1978 AgC 738] W. Saenger, K. Lindner. *Angew. Chem.*, **90**, 738 (1978).
- [1978 CL 327] K. Uekama, F. Hirayama, M. Daiguyi. *Chem. Lett.*, 327 (1978).
- [1978 CL 661] K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie. *Chem. Lett.*, 661 (1978).
- [1978 CL 703] K. Uekama, F. Hirayama, N. Matsuo, H. Koinuma. *Chem. Lett.*, 703 (1978).
- [1978 CL 1109] K. Uekama, T. Irie, F. Hirayama. *Chem. Lett.*, 1109 (1978).
- [1978 CPB 1195] K. Uekama, F. Hirayama. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1195 (1978).
- [1978 CPB 3419] Y. Nakai, S. Nakajima, K. Yamamoto, K. Terada, T. Konno. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3419 (1978).
- [1978 CPB 3477] K. Uekama, F. Hirayama, S. Nasu, N. Matsuo. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 3477 (1978).
- [1978 CPL 207] R. Humphry-Baker, Y. Mordi, M. Gratzel. *Chem. Phys. Lett.*, **58**, 207 (1978).
- [1978 CPL 429] K. Zachariasse. *Chem. Phys. Lett.*, **57**, 429 (1978).
- [1978 CW 78] C.H. MacGillavry. *Chem. Weekbl.*, **62**, 78 (1978).

- [1978 JACS 916] I. Tabushi, Y. Kiyosuke, T. Sugimoto, K. Yamamura. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 916 (1978).
- [1978 JACS 984] Y.C. Jean, H.J. Ache. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 984 (1978).
- [1978 JACS 2626] T. Takemura, P.K. Das, G. Hug, R.S. Becker. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 2626 (1978).
- [1978 JACS 3239] J.K. Thomas, P. Piciulo, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3239 (1978).
- [1978 JACS 5951] N.J. Turro, A. Yekta. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 5951 (1978).
- [1978 JAOAC 1370] J.N. Thompson, R. Madere. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **61**, 1370 (1978).
- [1978 JC 379] R.M. McKenzie, D.M. Hellwege, M.L. McGregor, N.L. Rockley, P.J. Riquetti, E.C. Nelson. *J. Chromatogr.*, **155**, 379 (1978).
- [1978 JC 421] C.V. Puglisi, J.A.F. de Silva. *J. Chromatogr.*, **152**, 421 (1978).
- [1978 JCIS 590] T. Brun, H. Hoiland, I. Vikingstadt, *J. Colloid Interface Sci.*, **63**, 590 (1978).
- [1978 JCSCC 386] R.M. Izatt, J.D. Lamb, B.E. Rossiter, N.E. Izatt, J.J. Christensen, B.L. Haymore, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **386** (1978).
- [1978 JCSPT 760] A. Cooper, D.D. McNicol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 760 (1978).
- [1978 JLR 32] C.A. Frolik, T.E. Tavela, M.B. Sporn. *J. Lipid Res.*, **19**, 32 (1978).

- [1978 JES 216] S.M. Park. *J. Electrochem. Soc.*, **125**, 216 (1978).
- [1978 JPC 2081] P.K. Das, R.S. Becker. *J. Phys. Chem.*, **82**, 2081 (1978).
- [1978 JPC 2805] E.A.G. Anianson. *J. Phys. Chem.*, **82**, 2805 (1978).
- [1978 PP 523] N. J. Turro, K. Liu, M.F. Chon, P. Lee. *Photochem. Photobiol.*, **27**, 523 (1978).
- [1979 AB 402] M.G.M. Deruyter, W.E. Lambert, A.P. De Leenheer. *Anal. Biochem.*, **98**, 402 (1979).
- [1979 ABB 577] A.M. McCormick, J.L. Napoli, H.K. Schnoes, H.F. DeLuca. *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 577 (1979).
- [1979 ACASH 27] J. Szejtli, L. Szente, E. Banky-Elöd. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **101**, 27 (1979).
- [1979 ACASH 265] B. Zsardon, M. Szilasi, K.H. Otta, F. Tudos, E. Fenyveski, J. Szejtli. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, **100**, 265 (1979).
- [1979 BCSJ 265] Y. Inoue, Y. Tokito, S. Tomouoh, R. Chujo. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 265 (1979).
- [1979 BCSJ 2678] H. Shimizu, A. Kaito, M. Hatano. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 2678 (1979).
- [1979 BioC 211] M. Ohara, H. Hettler, D. Gauss, F. Cramer. *Bioorg. Chem.*, **8**, 211 (1979).
- [1979 BioC 263] R.J. Bergeron, M.A. Channing, M.A. McGovern, W.P. Roberts. *Biorg. Chem.*, **8**, 263 (1979).

- [1979 CPB 76] K. Uekama, F. Hirayama, K. Esaki, M. Inoue. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 76 (1979).
- [1979 CPB 435] F. Hirayama, K. Uekama. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 435 (1979).
- [1979 IJVNR 347] B.A. Halley, E.C. Nelson. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **49**, 347 (1979).
- [1979 JACS 279] A. Almgren, F. Grieser, J.K. Thomas. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 279 (1979).
- [1979 JACS 1614] I. Tabushi, Y. Kuroda, K. Shimokawa. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1614 (1979).
- [1979 JACS 3283] B. Veyret, S.G. Davis, M. Yoshida, K. Weiss. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3283 (1979).
- [1979 JACS 4337] J. Michon, A. Rassat. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4337 (1979).
- [1979 JACS 4412] L.A. Powell, R.M. Wightman. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4412 (1979).
- [1979 JCIS 68] E. Vikingstad. *J. Colloid Interface Sci.*, **72**, 68 (1979).
- [1979 JC 113] B.A. Halley, E.C. Nelson. *J. Chromatogr.*, **175**, 113 (1979).
- [1979 JC 125] J.E. Paanakker, G.W.T. Groenendijk. *J. Chromatogr.*, **168**, 125 (1979).
- [1979 JCSPT 1560] Y. Murakami, Y. Aoyama, M. Kide, A. Nakano, K. Tabashi, C.D. Tran, Y. Matsuda. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1560 (1979).

- [1979 JCSPT 1669] Y. Murakami, A. Nakano, R. Miyata, Y. Matsuda. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1669 (1979).
- [1979 JJA 103] K. Uekama. *Jap. J. Antibio.*, **32**, 103 (1979).
- [1979 JLC 1097] M.A. Adams, K. Nakanishi. *J. Liq. Chromatogr.*, **2**, 1097 (1979).
- [1979 JPC 1805] E.S. Hall, H.J. Ache. *J. Phys. Chem.*, **83**, 1805 (1979).
- [1979 NJC 487] R. Fargues, M.T. Maurette, E. Oliveros, M. Riviere, A. Lattes, *Nouv. J. Chem.*, **3**, 487 (1979).
- [1979 PP 1001] K.T. Chihara, T. Takemura, T. Yamaoka, A. Schaffer, R.S. Becker. *Photochem. Photobiol.*, **29**, 1001 (1979).
- [1980 AC 754] L.J. Cline Love, M. Skrilec, J.G. Habarta. *Anal. Chem.*, **52**, 754 (1980).
- [1980 AC 1559] M. Skrilec, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **52**, 1559 (1980).
- [1980 ACIEE 344] W. Saenger. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344 (1980).
- [1980 AgC 344] W. Saenger. *Angew. Chem.*, **19**, 344 (1980).
- [1980 AP 97] M. Ottolenghi. *Adv. Photochem.*, **12**, 97 (1980).
- [1980 B 4589] H. Matsumoto, A.E. Asato, M. Denny, B. Baretz, Y.-P. Yen, D. Tong, R.S.H. Liu. *Biochemistry*, **19**, 4589 (1980).
- [1980 BCSJ 975] M. Aizawa, T. Komatsu, T. Nakagawa. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 975 (1980)

- [1980 BioC 450] R.I. Gelb, L.M. Schwartz, D.A. Laufer. *Biorg. Chem.*, **9**, 450 (1980).
- [1980 CL 1471] M. Komiyama, H. Hirai. *Chem. Lett.*, 1471 (1980).
- [1980 CPB 1552] Y. Nakai, S. Nakajima, K. Yamamoto, K. Terada, T. Konno. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1552 (1980).
- [1980 CR 283] J.K. Thomas. *Chem. Rev.*, **80**, 283 (1980).
- [1980 JACS 421] R. Breslow, M. Hammond, M. Lauer. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 421 (1980).
- [1980 JACS 488] B. Honig, U. Dinur, R.R. Birge, T.G. Ebrey. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 488 (1980).
- [1980 JACS 762] R. Breslow, M.F. Czarniecki, J. Emert, H. Hamaguchi. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 762 (1980).
- [1980 JACS 897] J.R. Kalman, D.H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 897 (1980).
- [1980 JACS 1152] I. Tabushi, Y. Kuroda, A. Mochizuki. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 1152 (1980).
- [1980 JACS 2115] R. Breslow, P. Bovy, C.L. Hersch. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2115 (1980).
- [1980 JACS 2504] K. Odashina, A. Itai, Y. Iitaka, K. Koga. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2504 (1980).
- [1980 JACS 2604] T. Takemura, K. Chihara, R.S. Becker, P.K. Das, G.L. Hug. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2604 (1980).

- [1980 JACS 2923] C.D. Tran, J.H. Fendler. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2923 (1980).
- [1980 JACS 2963] K. Chihara, W.H. Wadell. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2963 (1980).
- [1980 JACS 3188] A. Almgren, F. Grieser, J.K. Thomas. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3188 (1980).
- [1980 JACS 6355] C.G. Knudsen, S.C. Carey, W.H. Okamura. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 6355 (1980).
- [1980 JBC 8057] C.A. Frolik, P.P. Roller, A.B. Roberts, M.B. Sporn. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8057 (1980).
- [1980 JC 335] T.C. Chiang. *J. Chromatogr.*, **182**, 335 (1980).
- [1980 JC 395] K. Tsukida, R. Masahara, M. Ito. *J. Chromatogr.*, **192**, 395 (1980).
- [1980 JCSCC 921] A. Ueno, K. Takahashi, T. Osa. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 921 (1980).
- [1980 JEC 377] L.A. Powell, R.M. Wightman. *J. Electroanal. Chem.*, **106**, 377 (1980).
- [1980 JNSV 319] K. Tsukida, M. Ito. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 319 (1980).
- [1980 JPC 1485] J.H. Fendler. *J. Phys. Chem.*, **84**, 1485 (1980).
- [1980 JPC 1491] S. J. Gregorich, J.K. Thomas. *J. Phys. Chem.*, **84**, 1491 (1980).

- [1980 JPC 1495] C.E. Jones, L.E. Weaner, R.A. Mackay, *J. Phys. Chem.*, **84**, 1495 (1980).
- [1980 JPS 173] K.A. Connors, T.W. Rosanske. *J. Pharm. Sci.*, **69**, 173 (1980).
- [1980 P 779] J. Szejtli, E. Bolla-Putsztai, P. Szabo, T. Ferenczy. *Pharmazie*, **35**, 779 (1980).
- [1980 PJ 29] S. Nazakura, M. Furue, A. Harada. *Polym. J.*, **12**, 29 (1980).
- [1980 PP 739] P.K. Das, R.S. Becker. *Photochem. Photobiol.*, **32**, 739 (1980).
- [1980 VR 355] C.D.B. Bridges, S.-L. Fong, R.A. Alvarez. *Vision Res.*, **20**, 355 (1980).
- [1981 AB 324] A.C. Ross. *Anal. Biochem.*, **115**, 324 (1981).
- [1981 AC 437] L.J. Cline Love, J.G. Habarta, M. Skrilec. *Anal. Chem.*, **53**, 437 (1981).
- [1981 AC 1183] T. Cairns, E.G. Siegmund. *Anal. Chem.*, **53**, 1183A (1981).
- [1981 AC 1298] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs. *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- [1981 AC 1662] D.W. Armstrong, F. Noma. *Anal. Chem.*, **53**, 1662 (1981).
- [1981 AC 1872] L.J. Cline Love, M. Skrilec. *Anal. Chem.*, **53**, 1872 (1981).
- [1981 ACSB 2197] C.J. Simmons, R.S.H. Liu, M. Denny, K. Seff. *Acta Cryst. Sect. B*, **37**, 2197 (1981).

- [1981 AL 1659] D.W. Armstrong, W.L. Hinze, K.H. Bui, H.N. Singh. *Anal. Lett.*, **14**, 1659 (1981).

- [1981 BCSJ 513] H. Shimizu, A. Kaito, M. Hatano. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 513 (1981).

- [1981 BCSJ 828] M. Komiyama, H. Hirai. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 828 (1981).

- [1981 BCSJ 3128] M. Koshinuma, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54** , 3128 (1981).

- [1981 CJC 1865] R. Dehisi, G. Perron, J. Paquete, J.E. Desnoyers. *Can. J. Chem.*, **59**, 1865 (1981).

- [1981 CPB 2710] H. Ueday, T. Nagai. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 2710 (1981).

- [1981 CPB 3385] M. Ito, A. Kodama, K. Tsukida. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3385 (1981).

- [1981 ZC 28] E. Mueller-Doerfler, H. Dieter. *Z. Chem.*, **21**, 28 (1981).

- [1981 FPFASEB 859] M.E. Cullum, H.C. Furr, J.A. Olson. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **40**, 859 (1981).

- [1981 HCA 2746] M. Vecchi, G. Englert, R. Maurer, V. Meduna. *Helv. Chim. Acta*, **64**, 2746 (1981).

- [1981 JACS 154] G.L. Trainer, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 154 (1981).

- [1981 JACS 1750] R.J. Gelb, L.M. Schwartz, B. Cardelino, M.S. Fuhrman, R.F. Johnson, D.A. Laufer. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1750 (1981).

- [1981 JACS 5480] T. Yoruzo, K. Hayashi, M. Irie. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5480 (1981).
- [1981 JACS 7389] W.H. Waddell, K. Chihara. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7389 (1981).
- [1981 JAOAC 225] B.E. Giuliany. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 225 (1981).
- [1981 JC 35] Y. Mizobuchi, M. Taraka, T. Shono. *J. Chromatogr.*, **208**, 35 (1981).
- [1981 JC 109] B. Zsador, M. Szilasi, F. Tudos, J. Szejtli. *J. Chromatogr.*, **208**, 109 (1981).
- [1981 JCSCC 194] A. Ueno, K. Takahashi, Y. Hino, T. Osa. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 194 (1981).
- [1981 JCSCC 1137] J. Gabard, A. Collet. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1137 (1981).
- [1981 JES 1248] K.J. Stutts, L.A. Powell, R.M. Wightman. *J. Electrochem. Soc.*, **128**, 1248 (1981).
- [1981 JHRCCC 230] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **4**, 230 (1981).
- [1981 JLC 1065] W.G. Burkert, C.N. Owensby, W.L. Hinze. *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 1065 (1981).
- [1981 JPC 1418] H. Hoffmann, G. Platz, W. Ulbricht. *J. Phys. Chem.*, **85**, 1418 (1981).
- [1981 JPC 1820] M. Hoshino, M. Imamura, K. Ikehara, Y. Hama. *J. Phys. Chem.*, **85**, 1820 (1981).

- [1981 JPC 2047] M. Skrilec, L.J. Cline Love. *J. Phys. Chem.*, **85**, 2047 (1981).
- [1981 JSC 181] S.D. Christian, E.H. Lame, E.E. Trucker. *J. Sol. Chem.*, **10**, 181 (1981).
- [1981 LS 307] J. Pitha. *Life Sci.*, **29**, 307 (1981).
- [1981 PAH 204] O.I. Corrigan, C.T. Stanley. *Pharm. Acta Helv.*, **56**, 204 (1981).
- [1981 PP 267] M. Denny, M. Chun, R.S.H. Liu. *Photochem. Photobiol.*, **33**, 267 (1981).
- [1981 SpA 119] H. Yamaguchi, K. Ninomiya. *Spectrochim. Acta*, **37 A**, 119 (1981).
- [1981 Ta 717] J.J. Donkerbroek, J.J. Elzas, C. Grooijer, R.W. Frei, N.H. Velhorst. *Talanta*, **28**, 717 (1981).
- [1982 A 1073] H.N. Singh, W.L. Hinze. *Analyst.*, **107**, 1073 (1982).
- [1982 AB 428] T. Kurokawa, L.M. DeLuca. *Anal. Biochem.*, **119**, 428 (1982).
- [1982 AC 891] J.J. Donkerbroek, C. Grooijer, N.H. Velhorst, R.W. Frei. *Anal. Chem.*, **54**, 891 (1982).
- [1982 AC 1552] R. Weinberger, P. Yarmchuck, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **54**, 1552 (1982).
- [1982 ACASH 327] M. Kajtar, Cs. Horvath-Tono, E. Kuthi, J. Szejtli. *Acta Chim. Acad. Scient. Hung.*, **110**, 327 (1982).
- [1982 AL 221] H. Singh, W.L. Hinze. *Anal. Lett.*, **15**, 221 (1982).

- [1982 APCS 80] F. Møllgaard Andersen, M. Bundgaard. *Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed.*, **10**, 80 (1982).
- [1982 CPB 1796] Y. Nakai, Y. Yamamoto, K. Terada, H. Honbe. *Chem. Phar. Bull.*, **3**, 1796 (1982).
- [1982 CPL 321] K. Kano, I. Takenoshita, T. Ogawa. *Chem. Phys. Lett.*, 321 (1982).
- [1982 JACS 3249] G. Wipff, P. Weiner, P. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3249 (1982).
- [1982 JACS 3782] C.D. Gutsche, J.A. Levine. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3782 (1982).
- [1982 JACS 5826] J.R. Morán, S. Karbach, D.J. Cram. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5826 (1982).
- [1982 JACS 6283] R.I. Gelb, L.M. Schwartz, M. Radeos, R.B. Edmonds, D.A. Laufer. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6283 (1982).
- [1982 JC 241] T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa. *J. Chromatogr.*, **248**, 241 (1982).
- [1982 JC 244] B. Stancher, F. Zonta. *J. Chromatogr.*, **234**, 244 (1982).
- [1982 JC 303] J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurezak. *J. Chromatogr.*, **237**, 303 (1982).
- [1982 JCSCC 301] G.M. Lein, D.J. Cram. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 301 (1982).
- [1982 JCSCC 1386] H. Saito, G. Izumi, T. Mamizuka, S. Suzuki, R. Tabeta. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1386 (1982).

- [1982 JOC 1143] K. Hirotsu, T. Higuchi, K. Fujita, T. Ueda, A. Shinoda, T. Imoto, I. Tabushi. *J. Org. Chem.*, **47**, 1143 (1982).
- [1982 JPC 2388] R. Dorshow, J. Briggs, C.A. Burton, D. Nicoli. *J. Phys. Chem.*, **86**, 2388 (1982).
- [1982 JPP 627] K. Uekama, T. Fujinaga, F. Hiroyama, M. Otagiri, J. Kurona. *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 627 (1982).
- [1982 JPS 217] K.A. Connors, S.F. Lin, A.B. Wong. *J. Pharm. Sci.*, **71**, 217 (1982).
- [1982 P 725] J. Szejtli, E. Bolla-Pusztai, M. Kajatar. *Pharmazie*, **37**, 725 (1982).
- [1982 PP 325] N.J. Turro, T. Okubo, G.C. Weed. *Photochem. Photobiol.*, **35**, 325 (1982).
- [1982 S 532] R. Breslow. *Science*, **218**, 532 (1982).
- [1982 Ta 397] T. Taketatsu. *Talanta*, **29**, 397 (1982).
- [1983 A 1386] J.M. Escriche, M.D.G. Cirugeda, F.H. Hernández. *Analyst.*, **108**, 1386 (1983).
- [1983 AL 241] H. Singh, W.L. Hinze. *Anal. Lett.*, **15**, 241 (1983).
- [1983 IJP 253] K. Uekama, S. Narisawa, F. Hirayama, M. Otagiri, K. Kawaro, T. Ohtani, M. Ogino. *Int. J. Pharm.*, **13**, 253 (1983).
- [1983 IJP 327] K. Uekama, S. Narisawa, F. Hirayama, M. Otagiri. *Int. J. Pharm.*, **16**, 327 (1983).

- [1983 JACS 1626] C.G. Knudsen, R.A.S. Chandraratna, L.P. Walkeapää, Y.S. Chauhan, S.C. Carey, T.M. Cooper, R.R. Birge, W.H. Okumura. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1626 (1983).
- [1983 JC 83] J. Debowski, J. Jurezak, D. Sybilska. *J. Chromatogr.*, **282**, 83 (1983).
- [1983 JC 276] Y. Nobuhara, S. Hirano, Y. Nakanishi. *J. Chromatogr.*, **258**, 276 (1983).
- [1983 JCSCC 101] R.C. Helgeson, M. Lauer, D. Cram. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 101 (1983).
- [1983 JCSPT 1031] N. Kobayashi, R. Saito, H. Hino, Y. Hino, A. Ueno, T. Osa. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1031 (1983).
- [1983 JPC 1409] R. Dorshow, C.A. Burton, D. Nicoli. *J. Phys. Chem.*, **87**, 1409 (1983).
- [1983 JPC 1833] K. Kano, I. Takenoshita, T. Ogawa. *J. Phys. Chem.*, **86**, 1833 (1983).
- [1983 JPS 1333] S.F. Lin, K.A. Connors. *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1333 (1983).
- [1983 LS 719] J. Pitha, L. Szenté. *Life Sci.*, **32**, 719 (1983).
- [1983 PAH 338] K. Uekama, K. Oh, M. Otagiri, H. Seo, M. Tsurukoa. *Pharm. Acta Helv.*, **58**, 338 (1983).
- [1983 S 1177] D.J. Cram. *Science*, **219**, 1177 (1983).
- [1983 SpA 1421] L.J. Cline Love, R. Weinberger. *Spectrochim. Acta*, **38B**, 1421 (1983).

- [1983 T 1417] A.P. Groft, R.A. Bastch. *Tetrahedron*, **39**, 1417 (1983).
- [1984 AC 111] S. Taraba, H. Ozaki, K. Otsuka, K. Ichicakawa, A. Tsuchiya, T. Ando. *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
- [1984 AC 113] S. Taraba, K. Otsuka, K. Ichicakawa, A. Tsuchiya, T. Ando. *Anal. Chem.*, **56**, 113 (1984).
- [1984 AC 322] S. Scypinski, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **56**, 322 (1984).
- [1984 AC 327] R.A. Femia, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **56**, 327 (1984).
- [1984 AC 331] S. Scypinski, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **56**, 331 (1984).
- [1984 AC 1132] L.J. Cline Love, J.G. Habarta, J.G. Dorsey. *Anal. Chem.*, **56**, 1132A (1984).
- [1984 AC 1557] M. Arunyanart, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **56**, 1557 (1984).
- [1984 AC 2811] F.J. De Luccia, L.J. Cline Love. *Anal. Chem.*, **56**, 2811 (1984).
- [1984 ACA 159] A. Sanz Medel, J.I. García Alonso. *Anal. Chim. Acta*, **165**, 159 (1984).
- [1984 AL 251] M. Yamada, S. Suzuki. *Anal. Lett.*, **17**, 251 (1984).
- [1984 CPB 685] Y. Nakai, K. Yamamoto, K. Terada, K. Akimoto. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 685 (1984).
- [1984 CPB 839] K. Takamura, S. Inone, F. Kusu, M. Otagiri, K. Uekama. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 839 (1984).

- [1984 CPB 4682] Y. Nakamura, T. Sugama. *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4682 (1984).
- [1984 ICo 231] W. Saenger. *Incl. Compounds*, **2**, 231 (1984).
- [1984 IJP 51] F.M. Andersen, H. Bundgaard, H.B. Menzel. *Int. J. Pharm.*, **21**, 51 (1984).
- [1984 IJP 189] F. Møllgaard Andersen, H. Bundgaard. *Int. J. Pharm.*, **19**, 189 (1984).
- [1984 IL 60] S. Scypinski, L.J. Cline Love. *International Lab.*, 60 (1984).
- [1984 JACS 5947] V.J. Thön, C.C. Fox, J.C.A. Boeyens, R.D. Hancock, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5947 (1984).
- [1984 JACS 7607] K.A. Connors, D.D. Pendergast. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7607 (1984).
- [1984 JACS 8025] F. Diederich, K. Dick. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 8025 (1984).
- [1984 JCIS 152] S. Hashimoto, J.K. Thomas. *J. Colloid Interface Sci.*, **102**, 152 (1984).
- [1984 JCSs 441] D.W. Armstrong, W. Demond. *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 441 (1984).
- [1984 JIP 395] T. Cserhti, G. Oros, E. Fenyveski, J. Szejtli. *J. Incl. Phenom.*, **2**, 395 (1984).
- [1984 JIP 467] K. Inaba, T. Wakuda, K. Uekama. *J. Incl. Phenom.*, **2**, 467 (1984).

- [1984 JIP 533] D.W. Armstrong, A. Alak, K. Bui, W. Demond, T. Ward, T.E. Riehl, W.L. Hinze. *J. Incl. Phenom.*, **3**, 533 (1984).
- [1984 JIP 597] T. Imai, T. Irie, M. Otagiri, K. Uekama, M. Yamasaki. *J. Incl. Phenom.*, **2**, 597 (1984).
- [1984 JIP 815] T. Tamaki, T. Kokubu. *J. Incl. Phenom.*, **2**, 815 (1984).
- [1984 JIP 851] Y. Tanaka, S. Sasaki, A. Kobayashi. *J. Incl. Phenom.*, **2**, 851 (1984).
- [1984 JLC 1273] A. Alak, E. Heilweil, W.L. Hinze, H. Oh, D.W. Armstrong. *J. Liq. Chromatogr.*, **7**, 1273 (1984).
- [1984 JP 37] N. Muller, T. Wolf, G. Von Büнау, *J. Photochem.*, **24**, 37 (1984).
- [1984 JP 395] V. Ramesh, V. Ramamurthy. *J. Photochem.*, **24**, 395 (1984).
- [1984 JPC 2167] C.D. Tran, J.H. Fendler. *J. Phys. Chem.*, **88**, 2167 (1984).
- [1984 JPC 3163] M. Okazaki, K. Kuwata. *J. Phys. Chem.*, **88**, 3163 (1984).
- [1984 JPh 1263] S.J. Candau, E. Hirsh, R. Zana. *J. Phys. (Paris)*, **45**, 1263 (1984).
- [1984 JPP 621] O.I. Corrigan, C.T. Stanley. *J. Pharm. Pharmacol.*, **34**, 621 (1984).
- [1984 JPS 382] K. Uekama, F. Hirayama, A. Fujise, M. Otagiri, K. Inaba, H. Saito. *J. Pharm. Sci.*, **73**, 382 (1984).
- [1984 PP 185] G.S. Cox, N.J. Turro. *Photochem. Photobiol.*, **40**, 185 (1984).

- [1984 PP 597] G.S. Cox, P.J. Hauptman, N.J. Turro. *Photochem. Photobiol.*, **39**, 597 (1984).
- [1984 SpA 643] R. Woods, L.J. Cline Love. *Spectrochim. Acta*, **40A**, 643 (1984).
- [1984 T 545] I. Tabushi, Y. Kuroda, T. Mizutani. *Tetrahedron*, **40**, 545 (1984).
- [1984 T 552] I. Tabushi, Y. Kuroda, T. Mizutani. *Tetrahedron*, **40**, 552 (1984).
- [1984 Ta 361] J.I. García Alonso, M.E. Diaz García, A. Sanz Medel. *Talanta*, **31**, 361 (1984).
- [1984 Ta 909] T. Lougren, I. Hemmilla, K. Petterson, J.U. Eskola, E. Bertoft. *Talanta*, **31**, 909 (1984).
- [1984 TAC 143] W.L. Hinze, H.N. Singh, Y. Baba, N.G. Harvey. *Trends. Anal. Chem.*, **3**, 143 (1984).
- [1984 TL 1007] R.A.S. Chandraratna, R.R. Birge, W.H. Okamura, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 1007 (1984).
- [1985 AC 569] G. Patonay, M.E. Rollie, I.M. Warner. *Anal. Chem.*, **57**, 569 (1985).
- [1985 AC 1681] A. Sanz Medel, J.I. García Alonso. *Anal. Chem.*, **57**, 1681 (1985).
- [1985 ACA 1] E. Pelizzeti, E. Pramauro. *Anal. Chem. Acta.*, **169**, 1 (1985).
- [1985 ACA 3] L.J. Cline Love, M.L. Grayeski, J. Noroski, R. Weinberger. *Anal. Chim. Acta*, **170**, 3 (1985).

- [1985 ACA 95] M.A. Martín, M. Ballesteros, B. del Castillo. *Anal. Chim. Acta*, **170**, 95 (1985).
- [1985 ACA 355] O. Jules, S. Scypinski, L.J. Cline Love. *Anal. Chim. Acta*, **169**, 355 (1985).
- [1985 BC 157] O. Sinanoghi, A. Fernández. *Biophys. Chem.*, **21**, 157 (1985).
- [1985 Bi 7014] W. Freist, F. Cramer, *Biochim.*, **24**, 7014 (1985).
- [1985 CaR 12] Y. Inone, F.H. Kuan, Y. Takahashi, R. Chûjô, *Carbohydr. Res.*, **135**, 12 (1985).
- [1985 CTR 9] H.J. Gabius, K. Vehmeyer, R. Engelherdt, G.A. Nagel, F. Cramer. *Cell Tissue Res.*, **241**, 9 (1985).
- [1985 EST 155] R.A. Femia, S. Scypinski, L.J. Cline Love. *Environ. Sci. Technol.*, **19**, 155 (1985).
- [1985 JACS 2319] Y. Inone, H. Hoshi, M. Sakurai, R. Chûjô. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2319 (1985).
- [1985 JACS 4655] S. Hashimoto, J.K. Thomas. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4655 (1985).
- [1985 JC 39] K. Otsuka, S. Taraba, T. Ando. *J. Chromatogr.*, **348**, 39 (1985).
- [1985 JCIS 194] A. Berthold, J. Georges. *J. Colloid Interface Sci.*, **106**, 194 (1985).

- [1985 JCSCC 311] B.L. Allwood, F.H. Kohke, A.M.Z. Slawin, J.F. Stodtdart, D.J. Williams. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 311 (1985).
- [1985 JHRCCC 407] K.D. Lukacs, J.W. Jorgenson. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **8**, 407 (1985).
- [1985 JP 363] M. Mitsuzuka, K. Kikuchi, H. Kokubun, Y. Usui. *J. Photochem.*, **29**, 363 (1985).
- [1985 JPC 2432] S. Scypinski, J.M. Drake. *J. Phys. Chem.*, **89**, 2432 (1985).
- [1985 JPC 2996] N.J. Chang, E.W. Kaler. *J. Phys. Chem.*, **89**, 2996 (1985).
- [1985 JPh 2161] B. Cabane, R. Duplessix, T. Zemb. *J. Phys. (Paris)*, **46**, 2161 (1985).
- [1985 P 697] L. Szente, I. Apostol, J. Szejtli. *Pharmazie*, **39**, 697 (1985).
- [1985 PAH 117] K. Uekama, A. Sakai, K. Arimori, M. Otagiri, H. Saito. *Pharm. Acta Helv.*, **60**, 117 (1985).
- [1985 PI 61] K. Uekama. *Pharm. Int.*, **6**, 61 (1985).
- [1985 Ta 665] F.J. De Luccia, L.J. Cline Love. *Talanta*, **32**, 665 (1985).
- [1986 AC 1436] M.E. Díaz García, A. Sanz Medel. *Anal. Chem.*, **58**, 1436 (1986).
- [1986 AC 2096] T. Matsue, U. Akiba, T. Osa. *Anal. Chem.*, **58**, 2096 (1986).
- [1986 AC 2161] A. Sanz Medel, M.M. Fernández Pérez, M. de la Guardia Cirugueda, J.L. Carrión Domínguez. *Anal. Chem.*, **58**, 2161 (1986).

- [1986 ACA 179] M.H. Memon, P.J. Worsfold. *Anal. Chim. Acta*, **183**, 179 (1986).
- [1986 ARB 287] F.A. Quijcho. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 287 (1986).
- [1986 BCSJ 643] K. Miyajima, T. Mukai, N. Nakagaki, M. Otagiri, K. Uekama. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 643 (1986).
- [1986 BCSJ 2979] S. Hamai. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 2979 (1986).
- [1986 CL 377] H. Karafani. *Chem. Lett.*, 377 (1986).
- [1986 CSR 63] I.O. Sutherland. *Chem. Soc. Rev.*, **15**, 63 (1986).
- [1986 IJP 95] D.D. Chow, A.H. Karara. *Int. J. Pharm.*, **28**, 95 (1986).
- [1986 IJP 105] S.P. Jones, G.D. Parr. *Int. J. Pharm.*, **33**, 105 (1986).
- [1986 IJP 161] N. Rajagopalan, S.C. Chen, W.S. Chow. *Int. J. Pharm.*, **29**, 161 (1984).
- [1986 JC 356] T. Cserhti, J. Bojarski, E. Fenyveski, J. Szejtli. *J. Chromatogr.*, **351**, 356 (1986).
- [1986 JC 409] T. Takeuchi, H. Asai, D. Ishii. *J. Chromatogr.*, **357**, 409 (1986).
- [1986 JCSc 347] D.E. Burton, M.J. Sepeniak, M.P. Mascarinec. *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 347 (1986).
- [1986 JIP 55] T. Cserhti, B. Bordes, A. Kis-Tames, G. Mikite, J. Szejtli, R. Fenyveski. *J. Incl. Phenom.*, **4**, 55 (1986).

- [1986 JP 219] M.S. Syamala, S. Devanathan, V. Ramamurthy. *J. Photochem.*, **34**, 219 (1986).
- [1986 JP 239] T. Wolf, G. Von Büнау. *J. Photochem.*, **35**, 239 (1986).
- [1986 JPC 1963] G. Patonay, A. Shapira, P. Diamond, I.M. Warner. *J. Phys. Chem.*, **90**, 1963 (1986).
- [1986 SA 32] R.O. Hynes. *Scientific American*, **254**, 32 (1986).
- [1986 Ta 255] M.E. Diaz García, A. Sanz-Medel. *Talanta*, **33**, 255 (1986).
- [1986 Ta 697] M.C. García Alvarez-Coque, R.M. Villanueva Camañes, M.C. Martinez Vayé, G. Ramis Ramos, C. Mongay Fernandez. *Talanta*, **33**, 697 (1986).
- [1987 A 1037] F. García-Sánchez, M. Hernández López, J.C. Márquez Gómez. *Analyst.*, **112**, 1037 (1987).
- [1987 AC 84] D.W. Armstrong. *Anal. Chem.*, **59**, 84A (1987).
- [1987 AC 774] A. Sanz Medel, P.L.M. García, M.E. Diaz García. *Anal. Chem.*, **59**, 774 (1987).
- [1987 AC 1021] A.S. Cohen, S. Taraba, J.A. Smith, B.L. Kerger. *Anal. Chem.*, **59**, 1021 (1987).
- [1987 CPL 535] Y. Kusumoto. *Chem. Phys. Lett.*, **136**, 535 (1987).
- [1987 JCSPT 1121] R. Fornesier, F. Reniero, P. Serimin, U. Tonellato. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1121 (1987).
- [1987 JL 19] E.J. Wolf, M.L. Grayeski. *J. Lumin.*, **39**, 19 (1987).

- [1987 JLC 665] K.W. Street. *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 665 (1987).
- [1987 JPC 2739] A. Orstan, J.B.A. Ross. *J. Phys. Chem.*, **91**, 2739 (1987).
- [1987 JPC 5046] P. Bortolus, S. Monti. *J. Phys. Chem.*, **91**, 5046 (1987).
- [1987 MA 217] F. García-Sánchez, M. Hernández-López, E. De García Villodres. *Mikrochim. Acta.*, **2**, 217 (1987).
- [1987 MRC 208] D. Greatbanks, R. Pickford. *Magn. Reson. Chem.*, **25**, 208 (1987).
- [1987 TCC 21] D. Warsch, F. Vogtle. *Top. Curr. Chem.*, **140**, 21 (1987).
- [1988 AC 2751] E.A. Mularz, L.J. Cline Love, M. Petershein. *Anal. Chem.*, **60**, 2751 (1988).
- [1988 ACA 129] P. Martín, M.A. Martín, I. Caire, B. del Castillo. *Anal. Chim. Acta*, **212**, 129 (1988).
- [1988 ACA 235] M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz García, A. Sanz Medel. *Anal. Chim. Acta*, **212**, 235 (1988).
- [1988 ACA 251] G. Patonay, K. Fowler, G. Nelson, I.M. Warner. *Anal. Chem. Acta.*, **207**, 251 (1988).
- [1988 ACIEE 362] F. Diederich. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 362 (1988).
- [1988 AS 619] J.M. Bello, R.J. Hurtubise. *Appl. Spect.*, **42**, 619 (1988).
- [1988 CJC 325] R. Palepu, V.C. Reinsborough. *Can. J. Chem.*, **66**, 325 (1988).

- [1988 JC 175] A.W. Coleman, G. Tsoucaris, H. Parrot, H. Galons, M. Miocque, B. Perly, N. Keller, P. Charpin. *J. Chromatogr.*, **450**, 175 (1988).
- [1988 JC 299] R. A. Wallingford, A.G. Ewing. *J. Chromatogr.*, **441**, 299 (1988).
- [1988 JCSPT 543] A. Buvari, L. Barcza. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II.*, **543** (1988).
- [1988 JIP 277] G. Nelson, G. Patonay, I.M. Warner. *J. Incl. Phenom.*, **6**, 277 (1988).
- [1988 JPC 3582] D.J. Jobe, R.E. Verrall, R. Palepu, V.C. Reinsborough. *J. Phys. Chem.*, **92**, 3582 (1988).
- [1988 JPPA 329] P. Deval, A.K. Singh. *J. Photochem. Photobiol. A*, **42**, 329 (1988).
- [1988 JPPB 455] J. Blais, P. Prognon, G. Mahuzier, P. Vigny. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2**, 455 (1988).
- [1988 JPS 523] G. Smulevich, A. Feis, G. Mazzi, F.F. Vincieri. *J. Pharm. Sci.*, **77**, 523 (1988).
- [1988 MA 269] M.E. Díaz García, M.R. Fernández de la Campa, W.L. Hinze, A. Sanz Medel. *Mikrochim. Acta*, **3**, 269 (1988).
- [1988 PP 369] R.S. Becker. *Photochem. Photobiol.*, **48**, 369 (1988).
- [1988 PP 831] R.W. Curley Jr., J.W. Fowble. *Photochem. Photobiol.*, **47**, 831 (1988).

- [1989 AC 422] W.L. Hinze, D.Y. Parr, Z.S. Fu, W.G. Burkert. *Anal. Chem.*, **61**, 422 (1989).
- [1989 AC 905] G.C. Catena, F.V. Bright. *Anal. Chem.*, **61**, 905 (1989).
- [1989 AC 2463] M.D. Richmond, R.J. Hurtubise. *Anal. Chem.*, **61**, 2463 (1989).
- [1989 ACA 297] D.A. Lerner, B. del Castillo, S. Muñoz Botella. *Anal. Chim. Acta*, **227**, 297 (1989).
- [1989 AL 1567] I.R. Politzer, K.T. Crago, D.L. Kiel, T. Hampton. *Anal. Lett.*, **22**, 1567 (1989).
- [1989 AS 810] M.D. Richmond, R.J. Hurtubise. *Appl. Spect.*, **43**, 810 (1989).
- [1989 CaR 313] D. Wouessidjewe, A. Crassous, D. Duchêne, A. Coleman, N. Rysanek, G. Tsoucaris, B. Perly, F. Djedaini. *Carbohydr. Res.*, **192**, 313 (1989).
- [1989 CPB 1591] D. Teshima, K. Otsubo, S. Higuchi, F. Hirayama, K. Uekama, T. Aoyama. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1591 (1989).
- [1989 IJP 175] D. Amdidouche, H. Darrouzet, D. Duchêne, M.-C. Poelman. *Internat. J. Pharm.*, **54**, 175 (1989).
- [1989 JACS 6765] M.R. Eftink, M.L. Andy, K. Bystrom, M.D. Perlmutter, D.S. Kristol. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6765 (1989).
- [1989 JC 55] J. Liu, K.A. Cobb, M. Novotny. *J. Chromatogr.*, **486**, 55 (1989).

- [1989 JC 255] M.G. Motto, K.L. Facchine, P.F. Hamburg, D.J. Burinsky, R. Dunphy, A.R. Oyler, M.L. Cotter. *J. Chromatogr.*, **481**, 255 (1989).
- [1989 JCSCC 500] E. Dalcanale, P. Soncini, G. Bacchilega, F. Ugozzoli. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 500 (1989).
- [1989 JM 317] S.M. Ramasamy, R.J. Hurtubise. *J. Microchem.*, **40**, 317 (1989).
- [1990 A 359] W. Baeyens, B. Lin, V. Corbisier. *Analyst.*, **115**, 359 (1990).
- [1990 AC 1252] S. Nagase, M. Kataoka, R. Naganawa, R. Komatsu, K. Odashima, Y. Unezawa. *Anal. Chem.*, **62**, 1252 (1990).
- [1990 ACA 181] M.J. González Álvarez, M.E. Díaz García, A. Sanz Medel. *Anal. Chim. Acta*, **234**, 181 (1990).
- [1990 ACA 187] W.G. Baeyens, B. Lin Ling, V. Corbisier, A. Raemdonck. *Anal. Chim. Acta*, **234**, 187 (1990).
- [1990 DDIP 91] F.A. Menard, M.G. Dehiya, C.T. Rhodes. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **16**, 91 (1990).
- [1990 DDIP 2221] S.Y. Lin. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **16**, 2221 (1990).
- [1990 DDIP 2487] D. Duchêne, D. Wouessidjewe. *Drug Develop. Ind. Pharm.*, **16**, 2487 (1990).
- [1990 JACS 3583] W.G. Herkstroeker, P.A. Mertic, S. Farid. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 3583 (1990).
- [1990 JC 189] J. Liu, K.A. Cobb, M. Novotny. *J. Chromatogr.*, **519**, 189 (1990).

- [1990 JPBA 847] A.D. Cooper, T.M. Jeffenes. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **8**, 847 (1990).
- [1990 JPIC 65] J.D. Duncan, D.W. Armstrong. *J. Planar Chromatogr.*, **3**, 65 (1990).
- [1991 AC 1018] A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, V.C. Anigbogu, I.M. Warner. *Anal. Chem.*, **63**, 1018 (1991).
- [1991 AC 1902] M. Taghvaei, G.H. Stewart. *Anal. Chem.*, **63**, 1902 (1991).
- [1991 AC 2924] R.P. Frankewich, K.N. Thimmaiah, W.L. Hinze. *Anal. Chem.*, **63**, 2924 (1991).
- [1991 JACS 1573] A. Muñoz de la Peña, T.T. Ndou, J.B. Zurg, K.L. Greene, D.H. Live, I.M. Warner. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 1573 (1991).
- [1991 JC 111] K. Shimada, Y. Komine, K. Mitamura. *J. Chromatogr.*, **565**, 111 (1991).
- [1991 JCSCC 929] K. Takahashi. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 929 (1991).
- [1991 JCSFT 2699] S.E. Brown, J.H. Coates, S.F. Lincoln, D. Coghlen, C.L. Easton. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **87**, 2699 (1991).
- [1991 JHRC 361] J. Zukowski. *J. High. Resolut. Chromatogr.*, **14**, 361 (1991).
- [1991 JLC 605] K. Shimada, H. Yoshida, Y. Komine. *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 605 (1991).
- [1991 JLC 2109] K. Shimada, M. Nonaka. *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 2109 (1991).
- [1992 CR 1457] S. Li, W.C. Purdy. *Chem. Rev.*, **92**, 1457 (1992).

- [1992 JACS 445] M. Vicenti, E. Dalcanale, P. Soncini, G. Guglielmetti. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 445 (1992).
- [1992 JIPMRC 87] E. Dalcanale, G. Constantini, P. Soncini, *J. Incl. Phenom. Mol. Reconigit. Chem.*, **13**, 87 (1992).
- [1992 JOC 4608] P. Soncini, J. Bonsignora. *J. Org. Chem.*, **57**, 4608 (1992).

LIBROS:

- [1954 L XXXVI] F. Cramer: "*Einschlussverbindungen*", Springer-Verlag, Berlín, 1954.
- [1962 L I] L. Zechmeister: "*Cis-Trans Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes*", Springer-Verlag, Berlín, 1962.
- [1962 L XXXII] M. Hagan: "*Chlatrate Inclusion Compound*", Reinhold, Nueva York, 1962.
- [1964 L XXVI] Mulley, "*Advances in Pharmaceutical Sciences*", Vol. 1, Academic Press, Nueva York, 1964.
- [1964 L XXXIIIa] F.R. Seuti, S.R. Erlander: "Carbohydrates" en L. Mardelcorn (ed.): "*Non-stoichiometric Compounds*", Academic Press, Nueva York, 1964.
- [1964 L XXXIIIb] M.H. Powell en L. Mardelcorn (ed.): "*Non-stoichiometric Compounds*", Academic Press, Nueva York, 1964, p. 438.
- [1964 L XXXIIIc] L.C. Fetterly en L. Mardelcorn (ed.): "*Non-stoichiometric Compounds*", Academic Press, Nueva York, 1964, p. 491.

- [1965 L XXXV] J.A. Thome, L. Stewart. en R.L. Whistler y E.F. Paschall (ed.): *"Starch: Chemistry and Technology"*, Vol 1, Academic Press, Nueva York, 1965, p. 209.

- [1968 L XX] P.H. Elworthy, A.T. Florence, C.B. MacFarlane: *"Solubilization by Surface Active Agents"*, Chapman and Hall, Londres, 1968.

- [1968 L XIII] O. Sinanoghi en B. Pullman (ed): *"Molecular Associations in Biology"*, Academic Press, Nueva York, 1968, p. 427.

- [1969 L X] R.S. Mulliken, W.B. Person: *"Molecular Complexes"*. Wiley-Interscience, Nueva York, 1969.

- [1969 L XIV] W.P. Jencks: *"Catalysis in Chemistry and Enzymology"*, McGraw-Hill, Nueva York, 1969, pp. 417-436.

- [1970 L XXXVII] V.M. Bhatnagar: *"Clathrate Compounds"*, Chemical Publishing Co., Nueva York, 1970.

- [1971 L IIIa] J. Kahan en: *"Methods in Enzimology"*, Vol. 18C, (D.B. McCormick and L.D. Wright, eds.), Academic Press, Nueva York, 1971, pp. 574-591.

- [1971 L IIIb] M. Mousseron-Canet en: *"Methods in Enzimology"*, Vol. 18C, (D.B. McCormick and L.D. Wright, eds.), Academic Press, Nueva York, 1971, pp. 591-615.

- [1972 L V] W.H. Elliot, G.R. Walter en: *"Biochemical Applications of Mass Spectroscopy"* (G.R. Waller ed.), Wiley, Nueva York, 1972, pp. 499-536.

- [1973 L XXI] C. Tanford: *"The Hydrophobic Effect"* Wiley-Interscience, Nueva York, 1973.

- [1973 L XXIa] C. Tanford: "*The Hydrofobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*" (2ª ed.) Wiley-Interscience, Nueva York, 1973.
- [1973 L XXVIII] E.H. Cordes: "*Reaction Kinetics in Micelles*", Plenum Press, Nueva York, 1973.
- [1973 L XXVIIIa] J. Baumrucker, M. Calzadilla, E.M. Cordes, en E.H. Cordes (ed.): "*Reaction Kinetics in Micelles*", Plenum Press, Nueva York, 1973.
- [1974 L XV] A. Ben-Naim: "*Water and Aqueous Solutions*", Plenum Press, Nueva York, 1974, pp. 428-436.
- [1975 L XXIX] J.H. Fendler, E.J. Fendler: "*Catalysis in Micelles and Macromolecules Systems*", Academic Press, Nueva York, 1975.
- [1976 L XXV] M. Grätzel, J.K. Thomas: "The application of Fluorescence Techniques to the Study of Micellar Systems" en E.L. Wehry (ed.): "*Modern Fluorescence Spectroscopy*", Vol. 2, Plenum Press, Nueva York, 1976.
- [1976 L II] T. Rosenfeld, A. Alchalel, M. Ottolenghi en: "*Excited States of Biological Molecules*" (J.B. Birks ed.), Wiley, Nueva York, 1976, pp. 540-544.
- [1977 L XXX] J.R. Bolton (ed.): "*Solar Power and Fuels*", Academic Press, Nueva York, 1977.
- [1977 L XVI] K.L. Mittal (ed.): "*Micellization, solubilization and Microemulsions*", Plenum Press, Nueva York, 1977.
- [1977 L XXVII] V.K. Bensal, D.O. Shah, en L.M. Prince (ed.), "*Microemulsions*", Academic Press, Nueva York, 1977.

- [1977 L IL] M.L. Bender, M. Komiyama, en E.E. Van Tamelen (ed.), "*Bioinorganic Chemistry*", Vol.I, Cap. 2, Academic Press, Nueva York, 1977.
- [1978 L XLVIII] M.L. Bender, M. Komiyama: "*Cyclodextrin Chemistry*", Springer-Verlag, Berlín, 1978.
- [1979 L XVII] K.L. Mittal (ed.): "*Solution Chemistry of Surfactants*", Plenum Press, Nueva York, 1979.
- [1979 L XXIII] R.M. Pytkowicz (ed.). "*Activity Coefficients in Electrolyte Solutions*", Vols. 1 y 2, CRC Press, Boca Ratón, 1979.
- [1980 L XXIV] V. Degiorgio, M. Corti, M. Giglio (eds.): "*Light Scattering in Liquids and Macromolecular Solutions*". Plenum Press, Nueva York, 1980.
- [1980 L XI] C. Tanford: "*The Hydrophobic Effect*", 2ª edición, Wiley-Interscience, Nueva York, 1980.
- [1980 L VI] A.M. McCormick, J.L. Napoli, H.F. DeLuca en: "*Methods in Enzymology*" , Vol. 67, (D.B. McCormick y L.D. Wright, eds.), Academic Press, Nueva York, 1980, pp. 220-233
- [1981 L XXXVIII] F. Vögtle (ed.): "*Host Guest Complexs Chemistry*", Vol. 1, Springer-Verlag, Berlín, 1981.
- [1981 L XXXVIIIa] D.J. Cram, K.N. Trueblood en F. Vögtle (ed.): "*Host Guest Complexes Chemistry I*", Vol. 1, Springer-Verlag, Berlín, 1981.
- [1981 L XLIV] M. Dobler: "*Ionophores and their structures*", John Wiley, Nueva York, 1981.
- [1981 L XLVII] F. de Jong, D.M. Reinhondt: "*Stability and Reactivity of Crown Ether Complexes*", Academic Press, Londres, 1981.

- [1982 L XXXI] J.H. Fendler: "*Membrane Mimetic Chemistry*", Wiley, Nueva York, 1982.
- [1982 L XVIII] K.L. Mittal, E.J. Fendler (eds.): "*Solution Behaviour of Surfactants: Theoretical and Applied Aspects*", Plenum Press, Nueva York, 1982.
- [1982 L IXL] F. Vögtle (ed.): "*Host Guest Complexes Chemistry*", Vol. 2, Springer-Verlag, Berlín, 1982.
- [1982 L XXXIV] J. Szejtli: "*Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*", Akadémiai Kiado, Budapest, 1982.
- [1982 L XXXIVa] J. Szejtli: "*Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*", Akadémiai Kiado, Budapest, 1982, p. 190.
- [1982 L XXXIVb] J. Szejtli: "*Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*", Akadémiai Kiado, Budapest, 1982, p. 193.
- [1982 L IVb] C.D.B. Bridges, R.A. Álvarez en "*Methods in Enzymology*", Vol. 81, (L. Packer ed.), Academic Press, Nueva York, 1982, pp. 463-485.
- [1982 L IVa] R.A. Blatchly, K. Nakanishi, en "*Methods in Enzymology*", Vol. 88, (L. Packer ed.), Academic Press, Nueva York, 1982, pp. 491-496.
- [1983 L XLIII] B. Allaart, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson: "*Molecular Biology of the Cell*", Garland, Nueva York, 1983.
- [1983 L XLV] I. Tabushi, K. Yamamura. en F. Vögtle (ed.): "*Cyclophanes I*", Springer, Berlín, 1983.
- [1983 L LI] Y. Murakami en F. Vögtle (ed.): "*Cyclophanes II*", Springer, Berlín, 1983.

- [1984 L VII] M. B. Sporn, A.B. Roberts, D.S. Goodman (eds.): "*The Retinoids*". Academic Press, Inc., Orlando, 1984.
- [1984 L XIX] K.L. Mittal and B. Lindman (eds.): "*Surfactants in Solution*", Plenum Press, Nueva York, 1984.
- [1984 L XLVI] T. Vo-Dinh: "*Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*", John Wiley and Sons, Nueva York, 1984.
- [1984 L XL] F. Vögtle (ed.): "*Host Guest Complexs Chemistry*", Vol. 3, Springer-Verlag, Berlín, 1984.
- [1984 L XLI] F. Vögtle, E. Weber (ed.): "*Stereochemistry*", Springer-Verlag, Berlín, 1984, p. 131.
- [1984 L L] W. Saenger: "Structural Aspects of Cyclodextrins and their Inclusion Complexes" en J.L. Atwood, J.E. Davies, D.D. McNicol (eds.): "*Inclusion Complexes*", Vol. 2, Academic Press, Londres, 1984.
- [1985 L XII] J.N. Israelachvili: "*Intermolecular and Surface Forces*", Academic Press, Londres, 1985, pp. 103-106.
- [1987 L XXII] R. Zana (ed.): "*Surfactant Solutions: New Methods of Investigation*". Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987.
- [1987 L XLII] D. Duchêne (ed.): "*Cyclodextrins and their industrial uses*". Editions de Santé, París, 1987.
- [1987 L XLIIa] F. Cramer en D. Duchêne (ed.): "*Cyclodextrins and their industrial uses*". Editions de Santé, París, 1987, p.9.
- [1987 L XLIIb] P.J. Sicard, M.H. Saniez. "Biosynthesis of Cicloglicosiltransferase and Obtention of Its Enzimatic Reaction Products", en D. Duchêne

(Ed.): *"Cyclodextrins and their industrial uses"*. Editions de Santé, París, 1987.

- [1989 L LIII] D. Scybilske, J. Zukowski, en A.M. Krstulovic (ed.): *"Chiral Separations by HPLC"*, John Wiley, Nueva York, 1989.
- [1989 L LVI] Y.L. Ford, P. Timmins, *"Pharmaceutical Thermal Analysis. Techniques and Applications"*. Ellis Horwood Limited, Chichester 1989.
- [1990 L LII] R.J. Hurtubise: *"Phosphorimetry. Theory, instrumentation and Applications"*, U.C.H. Nueva York, 1990.
- [1990 L VIII] K.A. Connors: *"Chemical Kinetics: The Study of the Reaction Rates in Solution"*, U.C.H. Nueva York, 1990.
- [1990 L IX] E.L. Wehry: *"Effects of Molecular Environment on Fluorescence and Phosphorescence"* en G.G. Guilbaut (ed.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1990, p. 75.
- [1990 L LV] S.E. Muñoz Botella, Memoria de licenciatura (tesina) por la Universidad Complutense de Madrid (Facultad de Farmacia), 1990.
- [1991 L LIV] M. Chentit, Memoria de licenciatura (DEA) por la Universidad de Montpellier II (Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier), 1991.

Presidencia:

Dr. E. Torija J. S. S.

Vocales:

Dr. M. Valcarlos Lase,

Dr. M. Dalmás Bañals

Dr. J. Wornha de Naveira

Secretario:

Dr. Sopen Reideras de la Rocha

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al

MARGEN SE EXPRESA para juzgar esta tesis doctoral,

ACORDÓ POR UNANIMIDAD calificarla

DE APTO CUM LAUDE

MADRID, 8 de julio de 1994

El Secretario del Tribunal,

